

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

Date of mailing: 26 September 1996 (26.09.96)	To:  United States Patent and Trademark Office (Box PCT) Crystal Plaza 2 Washington, DC 20231 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  in its capacity as elected Office
International application No.: PCT/JP96/00734	Applicant's or agent's file reference: SD-239
International filing date: 21 March 1996 (21.03.96)	Priority date: 20 March 1995 (20.03.95)
Applicant: KAYAGAKI, Nobuhiko et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:  
16 July 1996 (16.07.96)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer:  J. Zahra Telephone No.: (41-22) 730.91.11
---	---

✓ 44-384 MAY 1964

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
DOCUMENT TRANSMITTED

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 01 August 1997 (01.08.97)	International filing date (day/month/year) 21 March 1996 (21.03.96)
International application No. PCT/JP96/00734	Applicant SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD. et al

The International Bureau transmits herewith the following documents and number thereof:

copy of the English translation of the international preliminary examination report (Article 36(3)(a))

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Sean Taylor
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

BEST AVAILABLE COPY

YAO SUBAILAW 1938

**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**TRANSLATION**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

(PCT Article 36 and Rule 70)

**28 Rec'd. 19 SEP 1997**

Applicant's or agent's file reference SD-239	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP 96/00734	International filing date (day/month/year) 21.03.96	Priority date (day/month/year) 20.03.95
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K16/18, C12N15/13, C12N15/06, C12P21/08, C12N5/20, G01N33/577, G01N33/53, A61K39/395// (C12P21/08, C12R1:91)		
Applicant SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>4</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>16</u> sheets.</p> <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priority</li> <li>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of the invention</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement</li> <li>VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</li> </ul>
--

Date of submission of the demand 16.07.96	Date of completion of this report 03.04.97
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International Application No.

PCT/JP96/00734

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.):

the international application as originally filed.  
 the description, pages 1-23,25-31,34-101 , as originally filed,  
                                  pages , filed with the demand,  
                                  pages , filed with the letter of 24.12.96  
                                  pages , filed with the letter of  
  
 the claims, Nos. , as originally filed,  
                                  Nos. , as amended under Article 19,  
                                  Nos. , filed with the demand,  
                                  Nos. 1-50 , filed with the letter of 24.12.96  
                                  Nos. , filed with the letter of  
  
 the drawings, sheets/fig 1-14 , as originally filed,  
                                  sheets/fig , filed with the demand,  
                                  sheets/fig , filed with the letter of  
                                  sheets/fig , filed with the letter of

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages  
 the claims, Nos. 51-56  
 the drawings, sheets/fig

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**International application No.  
PCT/JP 96/00734**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-50	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-50	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-50	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

The inventions of claims 1-50 are neither disclosed in any of the documents cited in the ISR nor obvious to a person skilled in the art.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 96/00734

## VI. Certain documents cited

## 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
PCT/JP 94/01899	(18.05.95)	(10.11.94)	(10.11.93)
PCT/US 95/00362	(13.07.95)	(06.01.95)	(07.01.94)

## 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)



AMENDMENT

(Amendment under the provisions of  
Article 11 of the Patent Law)

Dated: December 24, 1996

Hon. Commissioner of Patent Office

1. Indication of International Application: PCT/JP96/00734

2. Applicant:

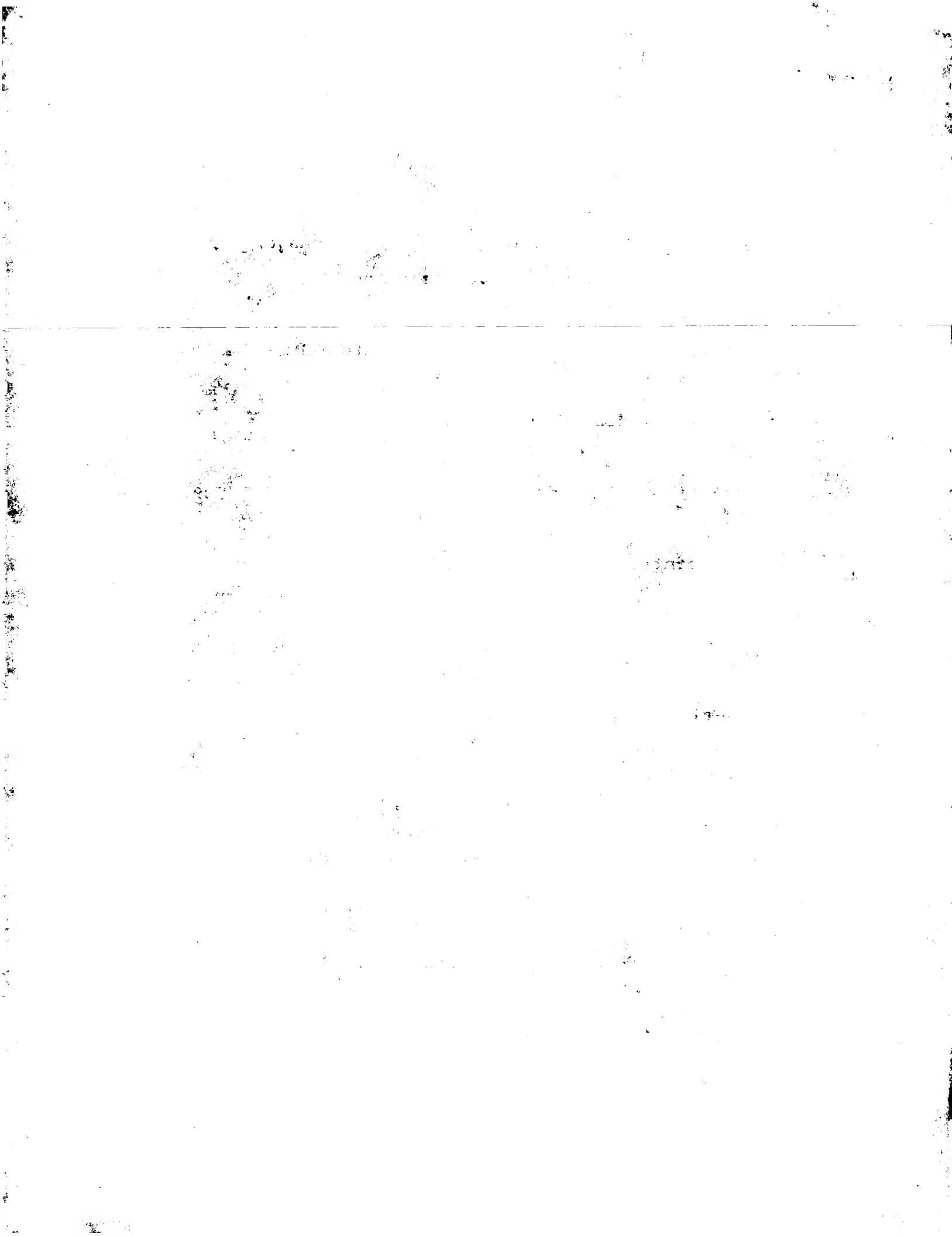
Name: SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.  
Address: 5-33, Kitahama 4-chome, Chuo-ku,  
Osaka-shi, Osaka 541 Japan  
Nationality: Japan  
Domicile: Japan

3. Agent:

Name: NISHIKAWA Shigeaki, Patent Attorney  
(Reg'n No. 9352)  
Address: Visual city 401, 43-8, Higashi-Nippori  
3-chome, Arakawa-ku, Tokyo 116 Japan

4. Subject of the Amendment:

Specification and Claims.



5. Details of the Amendment: See Appendixes

(1) In the description, page 24, line 14 (corresponding to page 31, line 13 of its English version), amend "immersed in a solution" to read --brought into contact with a solution--.

(2) In the description, page 32, lines 10-11 (corresponding to page 42, lines 25-27 of its English version), amend "According to the present invention, there are still further provided mutants of the monoclonal antibodies or active fragments thereof set forth in the above Items 6-10." as follows:

--According to the present invention, there are still further provided mutants of the above respective monoclonal antibodies or active fragments thereof. The term "mutant" as used herein is used in a sense generally used in this technical field and specifically means one having an amino acid sequence in which one to several amino acids have been deleted, substituted or inserted in its corresponding amino acid sequence set forth in each SEQ ID NO:, and maintaining the function (apoptosis inhibition function) of the monoclonal antibodies or the active fragments thereof.--

(3) In the description, page 32, lines 20-21 (corresponding to page 43, line 3 of its English version), amend "A mutant of a monoclonal antibody" to read --A monoclonal antibody--.

(4) In the description, page 33, lines 3-4 (corresponding



to page 43, line 17 of its English version), amend "A mutant of a monoclonal antibody" to read --A monoclonal antibody--.

(5) In the description, page 33, lines 12-13 (corresponding to page 44, line 4 of its English version), amend "A mutant of a monoclonal antibody" to read --A monoclonal antibody--.

(6) Delete claims 1-56 and add new claims 1-50.

- (1) New claim 1 corresponds to original claim 14.
- (2) New claim 2 corresponds to original claim 15.
- (3) New claim 3 corresponds to original claim 12.
- (4) New claim 4 corresponds to original claim 13.
- (5) New claim 5 corresponds to original claim 16.
- (6) New claim 6 corresponds to original claim 9.
- (7) New claim 7 corresponds to original claim 4.
- (8) New claim 8 corresponds to original claim 7.
- (9) New claim 9 corresponds to original claim 48.
- (10) New claim 10 corresponds to original claim 49.
- (11) New claim 11 corresponds to original claim 50.
- (12) New claim 12 corresponds to original claim 8.
- (13) New claim 13 corresponds to original claim 30.
- (14) New claim 14 corresponds to original claim 31.
- (15) New claim 15 corresponds to original claim 32.
- (16) New claim 16 corresponds to original claim 33.
- (17) New claim 17 corresponds to original claim 34.
- (18) New claim 18 corresponds to original claim 35.
- (19) New claim 19 corresponds to original claim 36.



- (20) New claim 20 corresponds to original claim 37.
- (21) New claim 21 corresponds to original claim 38.
- (22) New claim 22 corresponds to original claim 39.
- (23) New claim 23 corresponds to original claim 40.
- (24) New claim 24 corresponds to original claim 41.
- (25) New claim 25 corresponds to original claim 42.
- (26) New claim 26 corresponds to original claim 43.
- (27) New claim 27 corresponds to original claim 44.
- (28) New claim 28 corresponds to original claim 45.
- (29) New claim 29 corresponds to original claim 46.
- (30) New claim 30 corresponds to original claim 19.
- (31) New claim 31 corresponds to original claim 20.
- (32) New claim 32 corresponds to original claim 21.
- (33) New claim 33 corresponds to original claim 22.
- (34) New claim 34 corresponds to original claim 23.
- (35) New claim 35 corresponds to original claim 24.
- (36) New claim 36 corresponds to original claim 25.
- (37) New claim 37 corresponds to original claim 26.
- (38) New claim 38 corresponds to original claim 27.
- (39) New claim 39 corresponds to original claim 28.
- (40) New claim 40 corresponds to original claim 39.
- (41) New claim 41 corresponds to original claim 29.
- (42) New claim 42 corresponds to original claim 6.
- (43) New claim 43 corresponds to original claim 17.
- (44) New claim 44 corresponds to original claim 18.
- (45) New claim 45 corresponds to original claim 48.
- (46) New claim 46 corresponds to original claim 52.



- (47) New claim 47 corresponds to original claim 53.
- (48) New claim 48 corresponds to original claim 54.
- (49) New claim 49 corresponds to original claim 55.
- (50) New claim 50 corresponds to original claim 56.

6. List of Appended Documents:

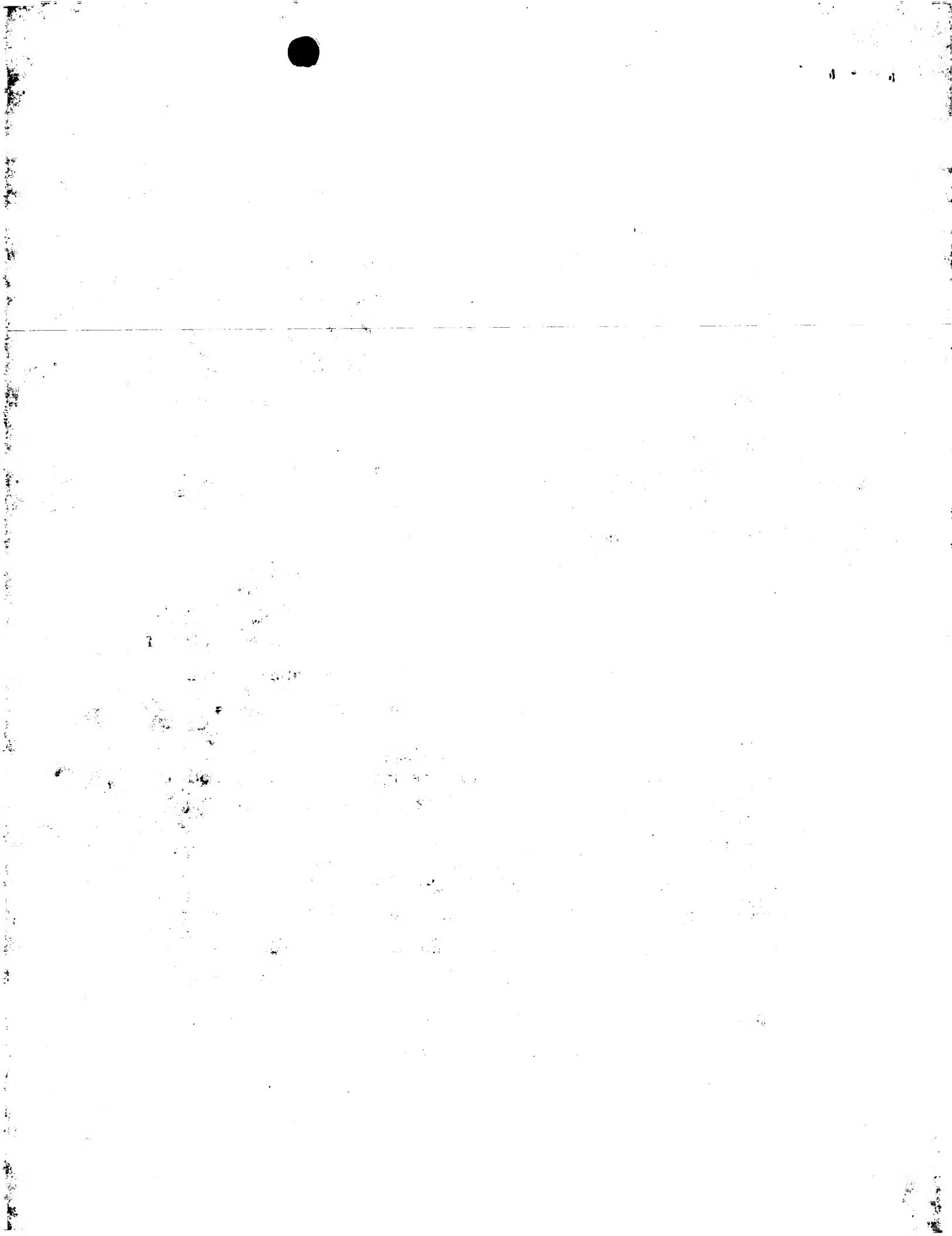
- (1) Substitute sheets for pages 24, each one copy  
32 and 33 (corresponding to pages  
31, 42, 43 and 44 of its English  
version) in the description
- (2) Substitute sheets for pages 102 each one copy  
to 113 (corresponding to pages 128  
to 144 of its English version) in  
the claims



are the same. On the other hand, the MHC class II of B6 and C3H mice derived from a Fas ligand reacting with KAY-10 are H-2<sup>b</sup> and H-2<sup>k</sup>, respectively.

A Fas ligand in a solution (blood, culture supernatant, body fluids, urine or the like) can be detected (further quantified) by using a plurality (for example, two kinds) of the monoclonal antibodies according to the present invention in combination. A preferable detection method is as follows. One of the plural 10 monoclonal antibodies is immobilized on a carrier. The other monoclonal antibody is labeled with a labeled compound. The carrier on which the monoclonal antibody has been immobilized is brought into contact with a solution of a specimen which is considered to contain a Fas ligand, 15 thereby adsorbing the specimen. The adsorbed specimen is then detected by the monoclonal antibody labeled with the labeled compound. Incidentally, an ELISA plate is preferred as the carrier.

More specifically, there is mentioned a method in 20 which a purified monoclonal antibody of IgM type is immobilized on a plate, and a Fas ligand in a solution is detected by a biotin-labeled monoclonal antibody of IgG type. According to, for example, a method in which a purified antibody of IgM type against Fas ligand is 25 immobilized on a plate, and a Fas ligand is detected by a biotin-labeled monoclonal antibody of IgG type against Fas ligand, a Fas ligand molecule in a solution can be



against human Fas ligand and has the following features:

(1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK5 deposited as Accession No. FERM BP-5048 in National Institute of

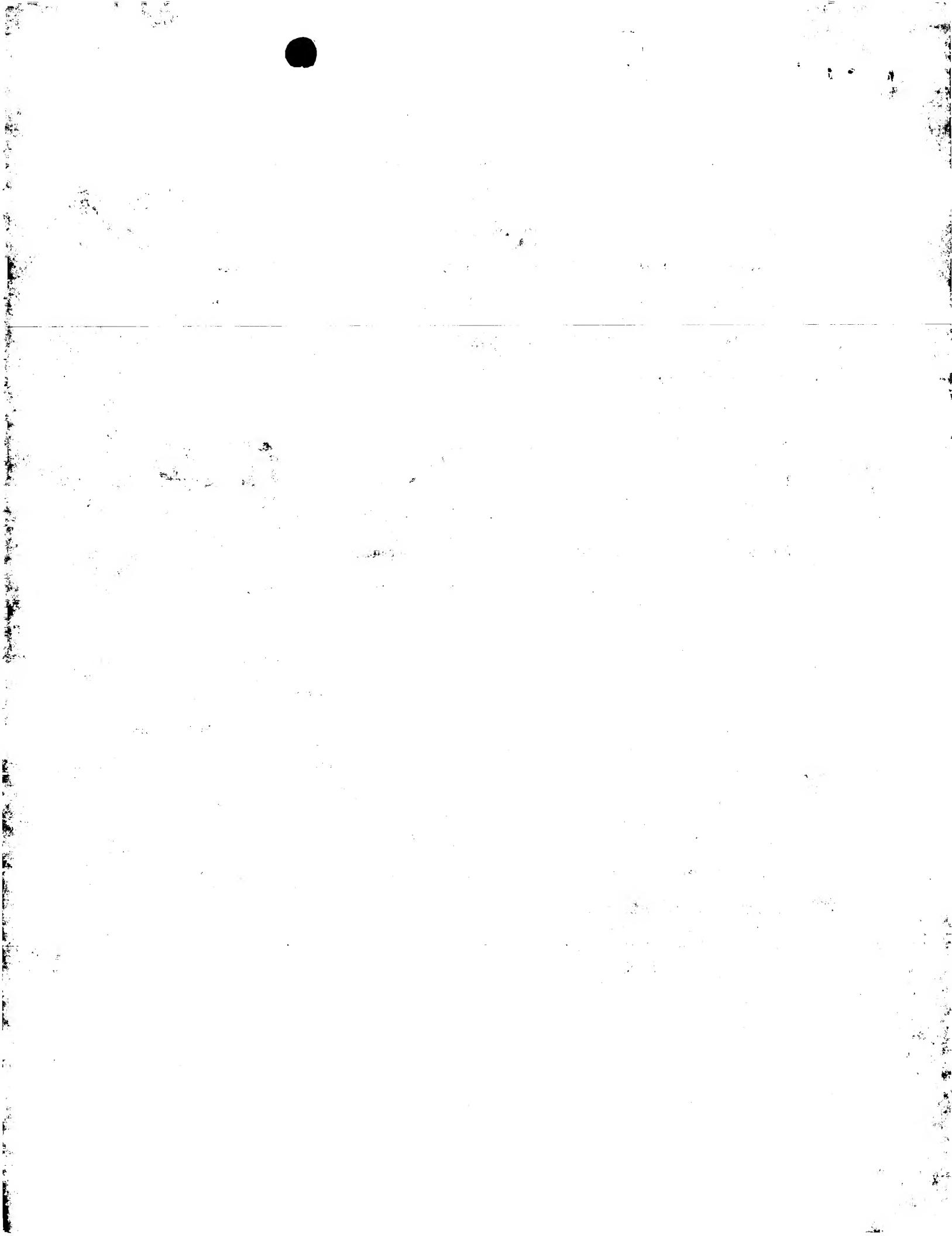
5 Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; (2) the variable region of the H chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:15 (the base sequence set forth in SEQ ID NO:16) of SEQUENCE LISTING; and/or (3) the variable region of the 10 L chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:17 (the base sequence set forth in SEQ ID NO:18) of SEQUENCE LISTING, or active fragments thereof.

According to the present invention, there are also provided DNAs or RNAs comprising at least a portion

15 encoding the hypervariable regions of the H chain or L chain set forth in any one of the above Items 1-5 in the above-described monoclonal antibodies or active fragments thereof.

According to the present invention, there are 20 further provided DNAs or RNAs comprising at least a portion encoding the variable region of the H chain or L chain set forth in any one of the above Items 6-10 in the above-described monoclonal antibodies or active fragments thereof.

25 According to the present invention, there are still further provided mutants of the above respective monoclonal antibodies or active fragments thereof. The



term "mutant" as used herein is used in a sense generally used in this technical field and specifically means one having an amino acid sequence in which one to several amino acids have been deleted, substituted or inserted in 5 its corresponding amino acid sequence set forth in each SEQ ID NO:, and maintaining the function (apoptosis inhibition function) of the monoclonal antibodies or the active fragments thereof.



Specific examples of these mutants include the following mutants.

11. A monoclonal antibody which is an antibody against human Fas ligand and has the following features:

5 (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK1 deposited as Accession No. FERM BP-5044 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; (2) the variable region of the H

10 chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:19 (the base sequence set forth in SEQ ID NO:20) of SEQUENCE LISTING; and/or (3) the variable region of the L chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:21 (the base sequence set forth in SEQ ID NO:22) of SEQUENCE LISTING, or active fragments thereof.

15

12. A monoclonal antibody which is an antibody against human Fas ligand and has the following features:

(1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK2 deposited as

20 Accession No. FERM BP-5045 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; (2) the variable region of the H chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:23 (the base sequence set forth in SEQ ID NO:24) of SEQUENCE LISTING; and/or (3) the variable region of the L chain consisting of the amino acid

25



sequence set forth in SEQ ID NO:25 (the base sequence set forth in SEQ ID NO:26) of SEQUENCE LISTING, or active fragments thereof.

13. A monoclonal antibody which is an antibody  
5 against human Fas ligand and has the following features:  
(1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that  
of an antibody produced by Hybridoma NOK3 deposited as  
Accession No. FERM BP-5046 in National Institute of  
Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial  
10 Science and Technology; (2) the variable region of the H  
chain consisting of the amino acid sequence set forth in  
SEQ ID NO:27 (the base sequence set forth in SEQ ID NO:28)  
of SEQUENCE LISTING; and/or (3) the variable region of the  
L chain consisting of the amino acid sequence set forth in  
15 SEQ ID NO:29 (the base sequence set forth in SEQ ID NO:30)  
of SEQUENCE LISTING, or active fragments thereof.

According to the present invention, there are yet  
still further provided DNAs or RNAs comprising at least a  
portion encoding the variable region of the H chain or L  
20 chain set forth in any one of the above Items 11-13 in the  
above-described monoclonal antibodies or active fragments  
thereof.

**[EXAMPLES]**

The present invention will hereinafter be described  
25 more specifically by the following Examples. However, the  
present invention is not limited to these examples only.



PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C07K 16/18, C12N 15/13, 15/06, C12P 21/08, C12N 5/20, G01N 33/577, 33/53, A61K 39/395 // (C12P 21/08, C12R 1:91)		26 PCT A1	(11) 国際公開番号 19 SEP 1997	WO96/29350
			(43) 国際公開日 1996年9月26日 (26.09.96)	
(21) 国際出願番号 (22) 国際出願日 1996年3月21日 (21.03.96)			(74) 代理人 弁理士 西川繁明(NISHIKAWA, Shigeaki) 〒116 東京都荒川区東日暮里三丁目43番8号 ビジュアル・シティー401号 Tokyo, (JP)	
(30) 優先権データ 特願平7/87420 1995年3月20日 (20.03.95) JP 特願平7/303492 1995年10月27日 (27.10.95) JP			(81) 指定国 AU, CA, JP, RU, US, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友電気工業株式会社 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 Osaka, (JP)			添付公開書類	国際調査報告書
(72) 発明者: および (73) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 樋垣伸彦(KAYAGAKI, Nobuhiko)[JP/JP] 八木田秀雄(YAGITA, Hideo)[JP/JP] 奥村 康(OKUMURA, Ko)[JP/JP] 〒113 東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学医学部免疫学教室内 Tokyo, (JP) 中田元巳(NAKATA, Motomi)[JP/JP] 〒244 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会社 横浜製作所内 Kanagawa, (JP)				

(54) Title : MONOCLONAL ANTIBODY REACTING SPECIFICALLY WITH Fas LIGAND AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称 Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体及びその製造方法

(57) Abstract

A monoclonal antibody reacting specifically with Fas ligands or the active fragment thereof; a process for producing a monoclonal antibody reacting specifically with Fas ligands; hybridomas producing a monoclonal antibody which reacts specifically with Fas ligands existing on the cell surface or soluble ligands; a method for detecting Fas ligands in a solution; and a kit for detecting Fas ligands which comprises a combination of monoclonal antibodies for Fas ligands.

(57) 要約

Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメント、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法、細胞表面に存在するFasリガンドまたは可溶性リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ、溶液中のFasリガンドを検出する方法、及びFasリガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせてなるFasリガンド検出用キットが提供される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LR	スリランカ	PTO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LS	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LT	レソト	RDE	スードン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LU	リトアニア	SS	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LV	ルクセンブルグ	EG	エジプト
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	シンガポール
BF	ブルギナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドバ共和国	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SS	スワジランド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	SZ	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TD	チад
CA	カナダ	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TG	トガ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TM	トルコメニスタン
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	TR	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	TT	トライノーラ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノールウェー	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン			VN	ヴィエトナム

## 明細書

Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体及びその  
製造方法

5

技術分野

本発明は、細胞表面に存在するFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体、その活性フラグメント、Fasリガンドの検出方法、及びFasリガンドを検出するためのキットに関する。

10 また、本発明は、細胞表面に存在するFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法、及び該モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマに関する。本発明のモノクローナル抗体は、細胞死におけるFasシステム等の解明、免疫治療や診断、Fasリガンドの検出、これらに関連した産業分野において有用である。

15 本発明において、活性フラグメントとは、抗体の抗原抗体反応活性を有するフラグメントを意味し、具体的には、 $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$ 、及び組み換え $Fv$ 体等を挙げることができる。

背景技術

20 多細胞生物は、その恒常性を保つために、細胞の増殖と死を巧妙にコントロールしている。個体発生の過程では、多くの細胞が細胞死によって除去される。また、成体においても、臓器を構成する細胞は、常に増殖と死のバランスを保ちながら、その機能を維持している。このような細胞死は、予め予定された死であり“programmed

25 cell death”とよばれ、物理的・化学的要因で引き起こされる不慮の死“accidental cell death”

と区別されている。これらの2つの死は、その過程が異なっている。すなわち、プログラム細胞死は、アポトーシスの過程によって起こるのに対し、アクシテンタルな細胞死では、ネクローシス（壊死）の過程を経て細胞が死滅する。

5 Fas抗原は、細胞死（アポトーシス）を媒介する細胞表面蛋白質である。最近、大阪バイオサイエンス研究所の伊藤直人博士・長田重一博士らの共同によりFas抗原のcDNAがクローニングされた（Cell, Vol. 66, p. 223-243, 1991）。得られたcDNAの構造から、ヒトFas抗原は、アミノ酸319  
10 残基からなる細胞膜貫通型蛋白質であり、1つの細胞膜貫通部分を有することが分った。Fas抗原の細胞外部分は、アミノ酸157残基から構成され、システイン残基に富む構造を有している。マウスFas抗原は、アミノ酸306残基からなり、ヒトFas抗原と49.3%の相同性を示す。

15 Fas抗原における細胞外部分のシステイン残基に富む構造は、NGF（神経成長因子：nerve growth factor）の低親和性レセプターやTNF（腫瘍壊死因子：tumor necrosis factor）のレセプターにも認められるよく保存された構造であることが判明した。これらの事実から、Fas  
20 抗原が、NGF/TNFレセプターファミリーに属する細胞表層蛋白質であることが明らかとなった。このファミリーに属する蛋白質の多くは、生体内にそのリガンドを有しているので、Fas抗原にも生体内にリガンドが存在していることが予想されていたが、1993年大阪バイオサイエンス研究所の長田重一博士のグループによりラ  
25 ットのFasリガンドの分子が同定された（Cell, Vol. 75, p. 1169-1178, 1993）。続いて、マウス及びヒトの

Fasリガンドの分子が、同グループにより同定された (Int. Immunol., Vol. 6 No. 10, p. 1567-1574)。

Fas抗原は、細胞に“死”というシグナルを伝えることが明らかになっている。抗Fas抗体は、ある種の細胞にアポトーシスを5誘導する。また、自己免疫疾患様の症状を示すlpr (lymphoproliferation) 変異をもつマウスでは、Fas遺伝子に変異が存在していることが見出されている。これらの結果から、Fas抗原などのアポトーシスを媒介する蛋白質の不活性化が細胞の異常増殖を引き起こし、一方、その異常な活性10化がある種の炎症反応を引き起こすことが示唆されている。

例えば、エイズ原因ウィルスHIV感染T細胞には、Fasの発現が認められること、(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 87, p. 9620-9624, 1990年)、抗Fas抗体 (Jo-2) をマウスに腹腔投与すれば、マウスは劇15症肝炎を起こして死ぬこと (Nature, vol. 364, p. 806-809, 1993年)、ウィルス性肝炎では、Fasの発現が認められること (Hepatology, vol. 19, p. 1354-1359, 1994年)、自己免疫疾患においても、SLE (全身性エリテマトーデス) やRA (慢性関節リウマチ) で報告が20なされている。これらはFas抗原に反応するFasリガンドによって引き起こされているのではないかと推察できるが、実際に確かめるには膨大な実験が必要である。

このように、Fas抗原の研究によって、免疫系では、細胞の外から“死”というシグナルを伝える系が働いていることが証明されている。しかしながら、発生や神経細胞での細胞死は、同様に外からのシグナルにより誘導されているのか (Fasのシステムが働い25

ているのか)、それともプログラム細胞死とよばれるように、細胞の中でプログラムされているのかは、未だに不明であり、その解明は、今後の大きな課題である。

細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達機構、すなわち、Fas 5 抗原からどのようなシグナル伝達機構によって、アポトーシスが誘導されるのかという問題も解明されていない。Fasのシステムを正確に理解するには、Fas抗原のリガンド(Fasリガンド)とその機能を明らかにし、リガンドとレセプターとの相互作用という観点からFasのシステムを見直す必要がある。

10 Fasリガンドは、先述のごとく、長田重一博士らによりその遺伝子が同定された。その結果、前記“Cell”の文献によれば、Fasリガンドは、278個のアミノ酸からなる分子量31,138の蛋白質であること、また、4カ所のN-グリコシド結合サイトがあり、糖蛋白質であること等が判明している(細胞工学、Vol. 15 13 No. 8, p 738-744, 1994)。

また、Hanabuchiらの文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, No. 11, p. 4930-4934, 1994)の報告によれば、キラーT細胞によるFas抗原を介した標的細胞破壊機構の解析の結果、パーフォリンを発現していないCD4<sup>+</sup>T細胞(CTL)による標的細胞破壊には、標的細胞上のFas抗原を介したアポトーシス・シグナルの伝達が関与している可能性が示され、それによってCD4<sup>+</sup>CTLの細胞表面にFasリガンドが存在していることが明らかになった。

さらには、自己免疫疾患様の症状を示すgld (generalized lymphoproliferative disease) 変異をもつマウスでは、Fasリガンドに変異が存在することが見い

出されている (Cell, Vol. 76, p. 969-979, 1994)。

しかし、現状は、Fasリガンドが生体の反応で重要であるのではないかとの認識がようやく得られたばかりである。このように、

現在、Fasリガンドの分子が同定されたばかりであり、Fasと

5 Fasリガンドの機序の解明の端についたばかりである。この機序を明らかにするには、蛋白質的（免疫化学的）解析、あるいはFasとFasリガンドの結合作用を阻害する中和抗体等の取得が必須となってくる。

10

### 発明の開示

本発明の目的は、細胞表面に存在するFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体、その活性フラグメント、該モノクローナル抗体の製造方法、及び該モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマを提供することにある。

15

また、本発明の目的は、FasリガンドとFasとの生理的反応を抑制（阻害）することができるFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を提供することにある。

さらに、本発明の目的は、該モノクローナル抗体の重鎖（H鎖）及び軽鎖（L鎖）の可変領域及び超可変領域のアミノ酸配列、及び

20

それをコードするDNAの塩基配列を決定することにある。

本発明の他の目的は、溶液中のFasリガンドを検出する方法、及びFasリガンド検出用キットを提供することにある。

本発明者らは、Fasリガンドに対するモノクローナル抗体を作

製すれば、Fasシステムの解析が進むのではないかと考え、鋭意

25

検討を重ねた結果、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体、及び該抗体を產生するハイブリドーマの取得に成功した。

さらに、Fasリガンドに特異的に反応する抗体等に関する研究を進め、その研究結果に基づいて、本発明を完成するに至った。

本発明によれば、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントが提供される。

5 本発明によれば、前記モノクローナル抗体の超可変領域及び可変領域のアミノ酸配列、及びそれをコードするDNAまたはRNAの塩基配列が提供される。

本発明によれば、Fasリガンドの細胞外部分のLSHKVYMRNSKYPQのアミノ酸配列の部分と反応する抗体が提供される。

10 本発明によれば、(1) 動物を、Fasリガンド分子またはFasリガンドを発現させた細胞で免疫感作する、(2) この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する、(3) 該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する、(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する、(5) ハイブリドーマを含有する培養上清液に分泌されている抗体が、Fasリガンドを発現させたCOS細胞の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する、(6) 所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養ウエル中の細胞群をクローニングする、(7) 所望の抗体を分泌しているクローニングを選択する、(8) 再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローニングを樹立する、(9) このハイブリドーマの培養上清液、あるいは該ハイブリドーマをマウス腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する、各工程を含むことを

特徴とする Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

また、本発明によれば、上記工程において、機能的な Fas 分子を発現していない動物（ヒトを除く）に、Fas リガンドまたは Fas リガンド発現細胞を免疫感作して Fas リガンドに対するモノクローナル抗体を得る方法、及び該方法により得られた Fas リガンドに対するモノクローナル抗体が提供される。

本発明によれば、細胞表面に存在する Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、Fas リガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、溶液中の Fas リガンドを検出する方法、及び Fas リガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせてなる Fas リガンド検出用キットが提供される。

#### 15 図面の簡単な説明

図 1 は、Fas リガンド - L 5 1 7 8 Y 細胞の染色パターンを示す F A C S c a n チャートである。図 1 中、1 は、「NOK5 抗体なし」の場合、2 は、「NOK5 抗体添加」の場合を示す。

図 2 は、L 5 1 7 8 Y 親株の NOK5 抗体無添加の場合の染色パターンを示す F A C S c a n チャートである。3 は、「NOK5 抗体なし」の場合を示す。

図 3 は、L 5 1 7 8 Y 親株の NOK5 抗体添加の場合の染色パターンを示す F A C S c a n チャートである。4 は、「NOK5 抗体添加」の場合を示す。

図 4 は、Fas リガンドの細胞障害性に対する、Fas リガンドに対するモノクローナル抗体及び Fas - Ig の抑制効果を示すグ

ラフである。

図5は、モノクローナル抗体NOK1によるFasリガンド分子の免疫沈降結果を示す図である。

図6は、2種類のFasリガンドに対するモノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチELISA法による可溶性Fasリガンドの定量結果を示すグラフ（標準曲線）である。

図7は、各疾患における血清中の可溶性Fasリガンド量の測定結果を示すグラフである。

図8は、活性化サル末梢血単核細胞表面にあるFasリガンドに対するモノクローナル抗体の反応性解析結果を示すFACScanチャートである。

図9は、FasリガンドとFasを介した細胞障害反応におけるFasリガンドに対する抗体の抑制効果を示すグラフである。

図10は、抗FasL抗体のVHの遺伝子及びVLの遺伝子のPCR反応液のミニゲル電気泳動図である。

図11は、NOK4のVLの遺伝子のPCR生成物のミニゲル電気泳動図である。

図12は、プラスミドDNAのミニゲル電気泳動図である。

図13は、モノクローナル抗体NOK1～5のVH領域（H鎖）のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域（CD1～3）である。

図14は、モノクローナル抗体NOK1、2、4、5のVL領域（L鎖）のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域（CD1～3）である。

図15は、モノクローナル抗体NOK1～3変異体のVH領域（H鎖）のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域

(C D 1 ~ 3) である。

図 1 6 は、モノクローナル抗体 N O K 1 ~ 3 の変異体の V L 領域 (L鎖) のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域 (C D 1 ~ 3) である。

5 図 1 7 は、B H K 細胞の染色パターンを示す F A C S c a n チャートである。図 1 7 中、破線は、「マウス F a s リガンドに対するモノクローナル抗体 (K A Y - 1 0 抗体) なし」の場合、実線は、「K A Y - 1 0 抗体添加」の場合を示す。

10 図 1 8 は、マウス F a s リガンドを発現させた B H K 細胞の染色パターンを示す F A C S c a n チャートである。図 1 8 中、破線は、「マウス F a s リガンドに対するモノクローナル抗体 (K A Y - 1 0 抗体) なし」の場合、実線は、「K A Y - 1 0 抗体添加」の場合を示す。

15 図 1 9 は、L 5 1 7 8 Y 細胞の染色パターンを示す F A C S c a n チャートである。図 1 9 中、破線は、「マウス F a s リガンドに対するモノクローナル抗体 (K A Y - 1 0 抗体) なし」の場合、実線は、「K A Y - 1 0 抗体添加」の場合を示す。

20 図 2 0 は、ヒト F a s リガンドを発現させた L 5 1 7 8 Y 細胞の染色パターンを示す F A C S c a n チャートである。図 2 0 中、破線は、「マウス F a s リガンドに対するモノクローナル抗体 (K A Y - 1 0 抗体) なし」の場合、実線は、「K A Y - 1 0 抗体添加」の場合を示す。

25 図 2 1 は、マウス F a s リガンドを発現させた L 5 1 7 8 Y 細胞の染色パターンを示す F A C S c a n チャートである。図 2 1 中、破線は、「マウス F a s リガンドに対するモノクローナル抗体 (K A Y - 1 0 抗体) なし」の場合、実線は、「K A Y - 1 0 抗体添加」の

場合を示す。

図18及び図21のみにピークのズレが見られ、マウスFasリガンドに対する抗体（KAY-10抗体）が、マウスFasリガンドを発現させたBHK細胞及びL5178Y細胞にのみ反応し、親株のBHK細胞及びL5178Y細胞やヒトFasリガンドを発現させたL5178Y細胞には反応しないことが示されている。  
5

図22は、Fasリガンドを発現したBalb/cマウスの活性化T細胞の染色パターンを示すFACScanチャートである。図22中、破線は、「マウスFasリガンドに対するモノクローナル抗体（KAY-10抗体）なし」の場合、実線は、「KAY-10抗体添加」の場合を示す。  
10

図23は、Fasリガンドを発現したB6マウスの活性化T細胞の染色パターンを示すFACScanチャートである。図23中、破線は、「マウスFasリガンドに対するモノクローナル抗体（KAY-10抗体）なし」の場合、実線は、「KAY-10抗体添加」の場合を示す。  
15

図24は、Fasリガンドを発現したDBAマウスの活性化T細胞の染色パターンを示すFACScanチャートである。図24中、破線は、「マウスFasリガンドに対するモノクローナル抗体（KAY-10抗体）なし」の場合、実線は、「KAY-10抗体添加」の場合を示す。  
20

図25は、Fasリガンドを発現したC3Hマウスの活性化T細胞の染色パターンを示すFACScanチャートである。図25中、破線は、「マウスFasリガンドに対するモノクローナル抗体（KAY-10抗体）なし」の場合、実線は、「KAY-10抗体添加」の場合を示す。  
25

図24では、ピークのズレが殆ど見られず、また、図22ではピークのズレが見られない。これより、マウスFasリガンドに対するモノクローナル抗体（KAY-10抗体）がDBAマウスやBalb/cマウス由来の細胞のFasリガンドとは反応が弱いか殆ど反応しないことが示されている。また、図23及び図25では、ピークのズレが見られ、KAY-10抗体がB6マウスやC3H由来の細胞のFasリガンドと良好に反応することが示されている。

図26は、マウスFasリガンドに対するモノクローナル抗体（KAY-10抗体）が、マウスFasリガンドが持つヒトFas発現細胞に対するアポトーシス能への抑制作用を示す図である。

図27は、マウスFasリガンドに対するモノクローナル抗体（KAY-10抗体）が、濃度依存的に種々のTh1タイプT細胞が持つアポトーシス誘導活性を抑制することを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

Fasリガンド（FasL）は、細胞死（アポトーシス）を媒介する細胞表面蛋白質であるFas抗原（単に、Fasということがある）のリガンドである。Fasリガンドは、その遺伝子の同定結果によれば、278個のアミノ酸からなる分子量31,138の蛋白質であることが判明している。現在までにヒト、ラット、及びマウスのFasリガンドが同定されている。本発明では、広くFasリガンドを対象とするが、これらの中でも、特に、種がヒト及びマウスのFasリガンドが好ましい。すなわち、本発明は、好ましくは、ヒトFas抗原のリガンド及びマウスFas抗原のリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体及びその活性フラグメントに関する。

本発明のモノクローナル抗体は、Fasリガンドに特異的に反応

するものであれば特に限定されないが、FasリガンドとFasとの生理的反応を阻害（抑制）することができるものであることが好ましい。ここでいう生理的反応を阻害する抗体とは、Fasリガンドを発現している細胞あるいは可溶型となったFasリガンド（sFasリガンド）がFasを発現している細胞に結合して、Fasを発現している細胞をアポトーシスにより死滅させるシグナルを与える時に、Fasと結合するFasリガンドの結合部位に対し、特異的に結合し、FasリガンドがFasと結合できなくなるようにできる抗体（中和抗体）をさす。すなわち、FasリガンドとFasとの生理的反応を阻害するモノクローナル抗体が存在すれば、Fasリガンドを発現している細胞あるいはsFasリガンドがFasを発現している細胞を死滅させることができなくなる。

しかも、FasリガンドとFasとの結合力よりも強い結合力を持つ抗体であることがより好ましい。具体的には、FasとIgGのFcとを結合させたキメラ分子（Fas-Ig）を指標に調べることができる。このFas-Igは、生体内のFasリガンドとFasとの結合力と同じ結合力でFasリガンドに結合することができる。したがって、Fasリガントに対する抗体が、Fas-Igキメラ分子よりも低濃度でFasリガンドとFasとの結合を阻害することができれば、実際、実用レベルでは生体内種々のFasリガンドによる作用を有効に阻害することができる。

本発明のヒトFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044（ハイブリドーマNOK1）、FERM BP-5045（ハイブリドーマNOK2）、FERM BP-5046（ハイブリドーマNOK3）、FERM BP-5047

(ハイブリドーマNOK4)、及びF E R M B P - 5 0 4 8 (ハイブリドーマNOK5)として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株から產生される各モノクローナル抗体 (NOK1~5)を挙げることができる。また、マウスF a sリガンドに対するモノクローナル抗体としては、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M - B P - 5 3 3 4 (ハイブリドーマK A Y - 1 0)として寄託されているハイブリドーマ細胞株から產生されるモノクローナル抗体を挙げることができる。

また、本発明のF a sリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、例えば、クラスまたはサブクラスが、それぞれマウスI g G<sub>1</sub>、マウスI g G<sub>2a</sub>、マウスI g M、マウスI g G<sub>3</sub>などのものが挙げられる。

本発明の抗体は、免疫化学的な研究のみならず、免疫治療や診断などに有用である。このような目的を達成するには、必ずしも抗体分子全体を用いる必要がなく、活性を有する限り、分子の一部を用いることができ、場合によってはその方が好ましいこともある。このことは、当業者であれば容易に理解できることである。したがって、本発明は、抗F a sリガンド抗体の活性フラグメントをも包含するものである。抗体は、特定の抗原物質を認識する均一な免疫グロブリンである。活性フラグメントとは、抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントを意味し、具体的には、F (a b')<sub>2</sub>、F a b'、F a b、F v、及び組換えF v体などを挙げることができる。

F (a b')<sub>2</sub>フラグメントは、免疫グロブリンI g Gをペプシンを用いて消化することにより得られるフラグメントの1つである。I g GをpH4.0付近でペプシン消化(pepsin digestion)すると、H鎖のヒンジ部で切断されて、分子量約10万のフラグメ

ントを生成する。この切断は、H鎖間のジスルフィド結合よりもC末端側で起こる。このフラグメントは、抗原結合部位が2個あるので、抗原に結合して、沈降反応や凝集反応を起こすことができる。

5 F a b' フラグメントは、F (a b')<sub>2</sub> フラグメントを2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化すると、H鎖間のジスルフィド結合が切断されて生じる分子量約5万のフラグメントである。

F a b フラグメント (antigen-binding fragment) は、I g G をパパイン消化 (papain digestion) 10 することにより得られるフラグメントの1つである。I g G をシステインの存在下にパパイン消化すると、ヒンジ部のH鎖間のジスルフィド結合よりN末端側の位置でH鎖を切断し、2個のF a b と1個のF c (crystallizable fragment) を生成する。F a b フラグメントは、H鎖のN末端側の約半分に相当15 するF d フラグメント (V<sub>H</sub>ドメイン + C<sub>H</sub>1ドメイン) とL鎖がジスルフィド結合した分子量約45,000のフラグメントである。F a b フラグメントは、抗原結合部位を1個有している。F v フラグメントは、非共役結合で結合したH鎖可変部 (V<sub>H</sub>) とL鎖可変部 (V<sub>L</sub>) からなる抗原結合可能なフラグメントである。

20 組換えF v 体は、モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマからD N A をシーケンスして、V<sub>H</sub>とL<sub>H</sub>をコードする各塩基配列を決定し、次いで、これらのD N A 断片をベクターに組み込んで、V<sub>L</sub> - Linker - V<sub>H</sub>の構造を有する一価の抗体活性フラグメントを產生させることにより得ることができる。I g G 、F a b またはF (a b')<sub>2</sub> では、V<sub>H</sub>とL<sub>H</sub>は、S - S 結合により結合しているが、組換え25 F v 体フラグメントでは、V H と L H との間にリンカーを挿入して、

S-S結合している状態と同様の立体構造がとれるようにしている。このフラグメントは、単にFvと呼ばれることがあり、また、scFv (single chain Fv) とも呼ばれている。組換えFv体は、大腸菌等の微生物やバクテリオファージによって発現させることもできる。

これらの活性フラグメントは、単独でも用いられるが、必要に応じて、アルブミン、ポリエチレングリコール等の物質と結合させ、新たな複合物として用いることができる。このような複合物は、一般に、生体内では、長時間分解されずにその効果を最大限まで発揮することが多い。活性フラグメントに、アルブミン、ポリエチレングリコール等の物質を付加する方法は、例えば、Antibodies, A. Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988に記載されている。一般的には、SPDP (ファルマシア製) 等の2価反応性試薬を用いれば、活性フラグメントをアルブミン等と容易に結合させることができる。

また、例えば、マウス由来の活性フラグメントを用いて、H鎖とL鎖におけるFabリガンドと反応するのに必要な領域 (例えば、超可変領域) 以外の一次構造をヒトの抗体の対応する一次構造に置き換えるなどの方法により、ヒト化抗体を得ることもできる。

本発明のモノクローナル抗体、及び該抗体を產生するハイブリドーマは、例えば、以下の方法により製造することができる。

(1) 動物 (例、マウスなどの齧歯類動物) であって、機能的なFab分子を発現していないものを、Fabリガンド分子またはFabリガンドを発現させた細胞 (例、COS細胞) で免疫感作する。

(2) この免疫感作した動物から抗体產生細胞を調製して、その懸

濁液を形成する。主として、脾臓細胞やリンパ節細胞を用いるが、末梢リンパ球を用いてもよい。脾臓細胞を使用する場合には、この免疫感作した齧歯類動物から脾臓を摘出して、脾細胞の懸濁液を形成する。

5 (3) 該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する。例えば、該脾細胞の懸濁液をマウスのミエローマ細胞と融合促進剤（例、ポリエチレングリコール）の存在下で混合して両細胞を融合する。電気的処理により細胞融合させることもできる。ここで用いるミエローマ細胞としては、次の選択培養において、抗体産生細胞と識別可能なもの（例、8-アザグアニン耐性株）を用いる。

10 (4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する。すなわち、抗体産生細胞は生存できるが、ミエローマ細胞は死滅する選択培地中で培養して、抗体産生細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを選別する。選択培地としては、例えば、8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞を用いた場合には、一般に、HAT培地（ヒポキサンチン-アミノブテリントミジン培地）を用いる。

15 (5) ハイブリドーマを含有する培養上清液に分泌されている抗体が、Fasリガンドを発現させた細胞（例、COS細胞）の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する。

20 (6) 所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養ウエル中の細胞群をクローニングする。クローニングは、通常、限界希釈法により行う。

(7) 所望の抗体を分泌しているクローンを選択する。

(8) 再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローンを樹立する。

5 (9) このハイブリドーマの培養上清液、あるいは該ハイブリドーマをマウス（例、ヌードマウス）腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する。

より具体的に、本発明のモノクローナル抗体、及び該モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、以下の方法により製造することができる。

10 (1) Fasリガンド発現COS細胞の調製

ヒトFasリガンドの遺伝子は、S. NagataらのInt. Immunol. Vol. 6, No. 10, p. 1567-1574に記載の配列を参考にして取得することができる。具体的には、FasリガンドcDNAの5'末端側と3'末端側について相補的な各DNAプライマーを合成し、これらのプライマーをもとに、ヒトキラーT細胞から調製したFasリガンドを含むcDNAを鑄型にして、PCR法によりFasリガンド遺伝子の增幅反応を行った後、得られたcDNAをベクターPMKittNeoに導入した。このFasリガンド遺伝子導入ベクターをDEAE-デキストラン法にてCOS細胞(ATCC CRL 1650)に導入(トランスフェクション)し、ヒトFasリガンド発現COS細胞を調製した。

(2) 免疫感作

Fasリガンドを発現しているCOS細胞を抗原として、齧歯類動物（例、MPL 1pr/1prマウス）に免疫感作する。MPL 25 1pr/1prを用いる理由としては、マウスをはじめとする齧歯類動物には、多くの組織でFasの発現がみられることを挙げる

ことができる。そのため、マウスなどをFasリガンドを発現している細胞免疫原（＝抗原）として免疫感作すれば、Fasを介した死のシグナルが入り、動物個体を死に至らしめる結果となり、不都合である。MPL<sup>lpr/lpr</sup>は、長田博士らの報告（Nature, 5 Vol. 356 p. 314-317, 1992）より明らかに、機能を持ったFasを発現していない、そのため、MPL<sup>lpr/lpr</sup>マウスに、Fasリガンドを持つ細胞を接種しても死ぬことはなく、十分な免疫感作が可能となる。

この他には、CBA<sup>lpr</sup>マウスがある。このマウスは、Fas抗原の発現は正常であるが、Fas抗原遺伝子の細胞内領域に点突然変異（point mutation）があり、そのためFasを介したアポトーシスシグナルの伝達異常が起きているマウスである。もちろん、この他にも人工的にFasを欠損したマウスを作ることも、現在の分子生物学の技術を持ってすれば、当業者ならば可能である。

また、MRL<sup>gld</sup>マウスは、先述したように、Fasリガンドが機能できなくなったFasリガンド変異マウスである。このマウスを用いて正常なFasリガンドを持つ細胞ないしFasリガンド分子で免疫すれば、Fasリガンドの機能に必要な部分を認識する抗体が得られるようになる。その理由は、正常Fasリガンドと変異Fasリガンドの違いは、アミノ酸でいえばわずか一箇所であり、この違いをMRL<sup>gld</sup>マウスは、抗原として認識する可能性が高く、Fasリガンドの機能に対する抗体を作りやすくなるからである。なお、正常Fasリガンドと変異Fasリガンドとの違いについては、Nagataらの文献Cell Vol. 76, p. 969-976 (1994) に記載のように、わずかマウスFas

リガンドの細胞外ドメインNo. 273のアミノ酸がフェニルアラニンからロイシンに変わっているのみである。

以上述べた種々のマウスは、今回作製したFasリガンドに対する抗体を得るためにマウスとして適している。なお、今回の実験では、MRL 1pr/1prマウスを用いた。

(3) この免疫感作した齧歯類動物から脾臓を取り出して、脾細胞の懸濁液を形成する。

(4) 免疫感作したマウスの脾細胞とマウスのミエローマ細胞とを融合促進剤（例、ポリエチレングリコール）の存在下で混合して両細胞を融合する。ミエローマ細胞としては、次の選択培養において、抗体産生細胞と識別可能なものの（例、8-アザグアニン耐性株）を用いる。

(5) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する。すなわち、抗体産生細胞は生存できるが、ミエローマ細胞は死滅する選択培地（例、HAT培地）中で培養することにより、目的とするモノクローナル抗体を産生する細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選択培養する。

(6) ハイブリドーマを含有する各培養ウエル中の上清液について、Fasリガンドを発現させたCOS細胞の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害すること、すなわち、キラー活性をブロックすることを指標にして、抗体の存在を確認する。具体的には、ハイブリドーマを含有する各培養ウエル中の上清液について、先ず、Fasリガンドと反応させる。次いで、ターゲットとしてFas抗原を細胞表面に発現するトランスフェクタントを用い、Fasリガンドのキラー活性をブロックするか否かを調べ、

キラー活性をブロックした培養上清のハイブリドーマを選択する方法がある。Fasリガンド発現細胞として、例えば、Fasリガンドを発現させたL5178Y細胞を用いることができる。

5 (7) 所望の抗体を產生するハイブリドーマを選択した後、限界希釈法により単一クローンにする。

(8) その単一クローンの培養上清液からモノクローナル抗体を回収する。

10 本発明のモノクローナル抗体は、Fasリガンドに特異的に反応する抗体である。Fasリガンドの種は、ヒトまたはマウスであることが好ましい。後述の実施例では、ヒトFasリガンドの遺伝子を用いて、遺伝子工学的手法によりFasリガンド発現COS細胞を調製し、マウス起源のモノクローナル抗体を得ている。

15 本発明のモノクローナル抗体は、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5044(ハイブリドーマNOK1)、FERM BP-5045(ハイブリドーマNOK2)、FERM BP-5046(ハイブリドーマNOK3)、FERM BP-5047(ハイブリドーマNOK4)、及びFERM BP-5048(ハイブリドーマNOK5)として寄託されているハイブリドーマ細胞株のいずれか1つから產生されるモノクローナル抗体である。また、マウスFasリガンドに対するモノクローナル抗体は、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM-BP-5334(ハイブリドーマKAY-10)として寄託されているハイブリドーマ細胞株から產生されるモノクローナル抗体である。

25 本発明のモノクローナル抗体は、ヒトFasリガンドに特異的に反応するものであることが好ましい。また、本発明のモノクローナ

ル抗体は、サル Fas リガンドとも反応するものであることが好ましい。したがって、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトまたはサルの Fas リガンドと Fas との生理的反応を抑制（阻害）することができるものであることが好ましい。しかし、マウス Fas リガ 5 ンドと Fas との生理的反応は抑制しないものであることが好ましい。Fas リガンドと Fas との生理反応の抑制の代表例は、Fas リガンド発現細胞が分泌する可溶性 Fas リガンドにより引き起こされる Fas 発現細胞のアポトーシスの抑制である。

本発明のモノクローナル抗体は、Fas リガンドの細胞外部分の 10 配列表の配列番号 31 に記載のアミノ酸配列部分と反応することができる。

本発明のモノクローナル抗体は、可溶性 Fas リガンドが Fas 発現細胞に対して引き起こすアポトーシスを 90 % 以上のアポトーシス抑制率で抑制することができる。ここで、アポトーシス抑制率 15 とは、Fas リガンドを遺伝子導入した細胞の培養上清の 12 倍希釈液中に中に含まれる可溶性 Fas リガンドをエフェクター分子とし、一方、Fas を遺伝子導入した細胞をターゲット細胞とし、両者を 96 ウエルプレート中で 100  $\mu$ l の反応系で反応させ、ターゲット細胞の 16 時間後の生存率を生細胞数検出試薬を用いて測定 20 する細胞障害反応試験において、抗体を添加したときのターゲット細胞の生存率を意味する。

モノクローナル抗体が前記ハイブリドーマ NOK 1 ないし NOK 5 のいずれか 1 つのハイブリドーマが產生するモノクローナル抗体である場合、Fas リガンドを遺伝子導入した細胞の培養上清の 12 倍希釈液中に中に含まれる可溶性 Fas リガンドをエフェクター分子とし、その希釈液 25  $\mu$ l を用い、一方、Fas を遺伝子導入し

た細胞 (Fas/WR19L) をターゲット細胞とし、該細胞の濃度  $2 \times 10^5 / \text{ml}$  液  $50 \mu\text{l}$  を用い、そして、前記モノクローナル抗体を含むハイブリドーマの培養上清  $25 \mu\text{l}$  を用い、これらのすべてを混合した後、 $37^\circ\text{C}$ で 16 時間反応させたとき、ターゲット細胞の生存率 (すなわち、アポトーシス抑制率) を 90 %以上とすることができる。

本発明のモノクローナル抗体のアポトーシスの抑制活性は、Fas-Ig キメラ分子よりも高いものである。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、 $0.01 \sim 8 \mu\text{g} / \text{ml}$  の濃度 (実効濃度) において、同濃度の Fas-Ig キメラ分子に比べて、高いアポトーシスの抑制活性を示す。

本発明のモノクローナル抗体は、Fas リガンド発現細胞の培養上清中に存在する可溶性 Fas リガンドをアフィニティー精製することができる。また、本発明のモノクローナル抗体は、Fas リガンド発現細胞上の Fas リガンド分子あるいは培養液中に分泌された可溶性 Fas リガンド分子を免疫沈降することができる。

本発明のモノクローナル抗体は、Fas リガンドと特異的に反応するため、細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達機構や Fas システムを解明するのに役立つことができる。また、本発明のモノクローナル抗体及びその活性フラグメントは、免疫治療や診断、及びこれらに関連した産業分野において有用である。例えば、Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を血液中の細胞と反応させ、蛍光標識の 2 次抗体をさらに結合させ、フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡で測定すれば、Fas リガンドがどの細胞に発現しているかを見極めることができる。本発明のモノクローナル抗体を FITC や PE などの蛍光色素に結合させることは、常法

により容易に行うことができる。したがって、本発明のモノクローナル抗体及びその活性フラグメントは、例えば、診断用の試薬として有用である。

種々の疾患（例えば、自己免疫疾患、リューマチ、肝炎など）の  
5 患者から取り出した組織等に対し、本発明のモノクローナル抗体を  
反応させることにより、Fasリガンドを発現している細胞が組織  
のどこに存在しているのかを調べることができる。

本発明のモノクローナル抗体は、ヒトの細胞表面上のFasリガンドあるいは可溶性Fasリガンドを認識（反応）し、かつ、サル  
10 の細胞表面上のFasリガンドをも認識することができるので、エイズやウイルス性肝炎等をはじめとする各種疾患に対する治療用抗体の検討に有用であるとともに、新しい治療薬のスクリーニングにおいて効果をモニターできるので、非常に有用である。

本発明のヒトFasリガンドに対するモノクローナル抗体は、Fas  
15 リガンドとFasとの生理的反応を抑制（阻害）する点において、  
ヒトのFasリガンドの生理的反応は阻害できるが、マウスのFas  
リガンドの生理的反応は阻害できないので、SCIDマウス等での  
検討に有用である。さらに、ヒトの細胞をマウスに移植した後の作用等を特異的に阻害させたり、モニターするのにも有用である。

20 本発明のマウスFasリガンドに対するモノクローナル抗体は、  
当該抗体を得るためにFasリガンドを免疫感作したマウスのMHC  
クラスIIのタイプと同じタイプに分類されるマウス由来のFasリ  
ガンドには反応しない。本発明のマウスFasリガンドに対するモノ  
クローナル抗体は、B6マウス、C3HマウスのFasリガンドを認識（反応）するが、Balb/cマウスのFasリガンドは認識しない。本発明のマウスFasリガンドに対するモノクローナル

抗体 (K A Y - 1 0 抗体) は、M A L g 1 d マウスに F a s リガンドを発現している C O S 細胞を免疫感作して得られたものである。

M R L g 1 d マウスのM H C クラスⅡは H - 2<sup>d</sup> であり、K A Y -

1 0 が反応しない F a s リガンドが由来する B a 1 b / c マウスや

5 D B A マウスのM H C クラスⅡも H - 2<sup>d</sup> であり、同じである。一方、

K A Y - 1 0 が反応する F a s リガンドが由来する B 6 マウス、C 3 H

マウスのM H C クラスⅡは、それぞれ H - 2<sup>b</sup> 、 H - 2<sup>k</sup> である。

本発明のモノクローナル抗体を複数 (例えば、2種類) 組み合わせて用いることにより、溶液 (血液、培養上清液、体液、尿液など)

10 中の F a s リガンドを検出 (さらには定量) することができる。複数のモノクローナル抗体のうち、一種のモノクローナル抗体を担体

に固定し、他種のモノクローナル抗体を標識化合物で標識し、そして、モノクローナル抗体を固定した担体を F a s リガンドを含むと思われる検体の溶液に浸漬して検体を吸着させ、吸着した検体を標

15 識化合物で標識したモノクローナル抗体により検出する検出方法が好ましい。なお、担体としては、E L I S A プレートが好ましい。

より具体的には、I g M タイプの精製したモノクローナル抗体を

プレートに固定し、I g G タイプのビオチン標識したモノクローナル抗体により、溶液中の F a s リガンドを検出する方法を挙げるこ

20 とができる。例えば、I g M タイプの精製した F a s リガンドに対する抗体をプレートに固定し、ビオチン標識した I g G タイプの F a s

リガンドに対する抗体で検出するという方法で、溶液中の F a s リガンド分子は、濃度が 1 n g / m l 以上のものを検出することができる。

25 さらに詳細には、例えば、I g M タイプである N O K 3 抗体の精製抗体を P B S (リン酸緩衝生理食塩水) で 1 0  $\mu$  g / m l 溶液に

調製したものを、ELISAプレートに50  $\mu$ l/well入れて、プレート底部に固定し、測定したい可溶性Fasリガンドを含むと思われる検体（サンプル）を適当な濃度にPBSあるいは10%FCS・RPMI1640培養液で希釈し、このサンプルをIgMタイプの5 NOK3抗体で固定したプレートに吸着し、吸着したサンプル中の可溶性Fasリガンドを、別の抗体であるビオチン等で標識したNOK1抗体で検出する検出方法がある。

この検出方法では、①1つ目の抗体を固相（例えば、プレート）に固定する、②抗体が吸着しなかった残りの部分をプロッキング剤10でブロックする、③測定したいサンプルを入れ、抗体に吸着させ、残りを洗い流した後、④2つ目の抗体には、適当な物質で標識しておき、この抗体をさらに反応させて、「抗体-測定したい物質（Fasリガンド）-標識した抗体」のコンプレックス（複合体）を固相上に形成し、⑤標識物質を指標に、標識物質と結合する蛍光物質や吸光物質を入れて、最終的にその蛍光強度または吸光強度を測定する。15

このとき、Fasリガンド分子のスタンダードが必要であるが、これは今回得られたFasリガンドに対するモノクローナル抗体を用いて精製することができる。すなわち、ヒトFasリガンドの遺伝子を導入したL5178Y（マウスT細胞株；ATTCから入手可能）である遺伝子導入細胞hFasL/L5178Yを無血清培地で大量に培養する。この細胞培養液から培養上清を回収（遠心分離により細胞を除去）し、分離膜等を用いて濃縮する。この濃縮した液をもとに精製を行う。精製は、Fasリガンドに対するモノクローナル抗体をセファロースのビーズに固定したアフィニティーカラムを用いて行うとよい。アフィニティーカラムは、CNBr（臭化プロニウム）で活性化したセファロースビーズにFasリガンド20

に対する抗体を結合させることにより作ることができる。このようにして h F a s L / L 5 1 7 8 Y の 1 リットルの培養上清から 2 ~ 3  $\mu$ g の可溶性の F a s リガンドが得られる。

また、複数（例えば、2種類）のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、F a s リガンド検出用キットを得ることができる。本発明の可溶性 F a s リガンドを検出するキットとしては、例えば、以下の構成のものが挙げられる。

表1

①	9 6 ウエル・マイクロプレート	1 枚
10	②ビオチン化NOK1抗体 (5 $\mu$ g / ml)	5 ml
	③NOK3抗体 (10 $\mu$ g / ml)	5 ml
	④ブロッキング液 (1 / 2 希釈ブロックエース)	20 ml
	⑤A B complex 液	A液 2. 5 ml B液 2. 5 ml
15	⑥基質液	10 ml
	⑦反応停止液	10 ml

もちろん、抗体を 9 6 ウエル・プレートに固定した状態で提供することもできるし、抗体を固定したビーズを用いこのビーズを小試験管に入れて、反応を行う形態も容易にとることができる。各成分の量比も、適宜変更することができる。

このような F a s リガンド検出用キットにより、F a s リガンド分子の濃度が少なくとも 0. 4325 ng / ml である溶液中の F a s リガンドを検出することができる。また、本発明のキットにより、例えば、伝染性単核球症 (IM) 、全身性エリテマトーデス (SLE) 、肝炎 (H e p a t i t i s) などに罹患したヒトの血液中の F a s リガンドの濃度を検出することができる。したがって、血液中の F a s

リガンドの濃度が健常人に比べて有意に高いことを指標にして、これらの疾患の診断を行うことができる。

本発明者らは、ヒト Fas リガンドに対するモノクローナル抗体 (抗 FasL モノクローナル抗体) の H鎖 (Heavy Chain) 5 及び L鎖 (Light Chain) の可変部領域のアミノ酸配列及びそれをコードする DNA の塩基配列を決定した。すなわち、抗 FasL モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ (例、ハイブリドーマ NOK1 ~ 5) から cDNA を抽出し、それから PCR 法及びミニゲル (mini gel) 電気泳動法により、H鎖可変 10 領域 ( $V_H$ ) 及び L鎖可変領域 ( $V_L$ ) をコードする DNA を回収した。該 DNA を導入した形質転換体を培養した後、プラスミド DNA を Dye-terminator 法により DNA シーケンスし、塩基配列を決定した。

また、該塩基配列からそれがコードするアミノ酸配列を求め、抗 15 FasL モノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を決定した。さらに、該アミノ酸配列について詳細に検討し、それぞれの超可変領域 (CDR1 ~ 3) のアミノ酸配列を決定した。これらの配列は、後記の配列表に示した。

モノクローナル抗体が抗原を認識する部位を可変領域という。そ 20 の中で、抗原と結合する部位を超可変領域 (CDR) という。可変領域には、超可変領域が 3 か所含まれる。超可変領域を保存し、可変領域の他の部分を立体構造をうまく保ち、かつ、他の種のものにより近くなるように替えてやることで、その種に応じた抗体が得られる。例えば、後述の実施例では、マウスの抗体が得られているが、 25 この超可変領域を保存し、可変領域の他の部分をできるだけヒトのものに近いものに替え、かつ、Fc 部分をヒトのものに替えること

で、ヒト型化抗体を得ることができる。最近では、HAMAの問題があり、単なるキメラ抗体（可変領域保存）にしたものから、超可変領域のみを保存した抗体に、治療用抗体が移りつつある。

抗FasLモノクローナル抗体のH鎖及びL鎖の可変部領域のアミノ酸配列及びそれらをコードするDNAの塩基配列の決定により、以下のようなモノクローナル抗体またはその活性フラグメントが提供される。

1. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044として寄託されているハイブリドーマNOK1が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の超可変領域が配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列の①30番目のSerから34番目のAsn、②49番目のArgから65番目のGly、及び③93番目のTyrまたは98番目のSerから109番目のTyrであり、及び／または(3) L鎖の超可変領域が配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列の①24番目のArgから34番目のAsn、②50番目のTyrから56番目のSer、及び③89番目のGlnから97番目のThrであるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

2. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5045として寄託されているハイブリドーマNOK2が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の超可変領域が配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列の①30番目のAsnから34番目のGly、②49番目のTyrから65番目のGly、及び③93番目のTyrまたは98番目のTyrから107番目の

T y r であり、及び／または（3）L鎖の超可変領域が配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列の①24番目のL y s から39番目のG l y 、②55番目のL e u から61番目のS e r 、及び③94番目のP h e または95番目のG l n から102番目のT h r であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

3. ヒトF a s リガンドに対する抗体であって、（1）そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 6 として寄託されているハイブリドーマN O K 3 が產生する抗体と同等であり、（2）H鎖の超可変領域が配列表の配列番号9で表されるアミノ酸配列の①30番目のS e r から34番目のA s n 、②49番目のA r g から65番目のG l y 、及び③93番目のT y r または98番目のA s p から105番目のV a l であり、及び／または（3）L鎖の超可変領域が配列表の配列番号29で表されるアミノ酸配列の①24番目のL y s から34番目のS e r 、②50番目のG l y から56番目のT h r 、及び③89番目のV a l または90番目のG l n から97番目のT h r であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

4. ヒトF a s リガンドに対する抗体であって、（1）そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 7 として寄託されているハイブリドーマN O K 4 が產生する抗体と同等であり、（2）H鎖の超可変領域が配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列の①32番目のT y r から35番目のA s n 、②50番目のT y r から65番目のA s n 、及び③93番目のT y r から107番目のT y r であり、及び／または（3）L鎖の超可変領域が配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列の①24番目のA r g から38番目のH i s 、②54番

目の Arg から 60 番目の Ser、及び③ 93 番目の Gin から 101 番目の Thr であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

5. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5048 として寄託されているハイブリドーマ NOK5 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の超可変領域が配列表の配列番号 15 で表されるアミノ酸配列の① 30 番目の Thr から 34 番目の His、② 49 番目の Tyr から 65 番目の Asp、  
10 及び③ 93 番目の Tyr から 106 番目の Tyr であり、及び／または (3) L鎖の超可変領域が配列表の配列番号 17 で表されるアミノ酸配列の① 24 番目の Lys から 34 番目の Ala、② 50 番目の Tyr から 56 番目の Thr、及び③ 89 番目の Gin から 97 番目の Thr であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。  
15

6. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044 として寄託されているハイブリドーマ NOK1 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号 2) であり、及び／または (3) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 3 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号 4) であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

7. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5045 として寄託されているハイブリドーマ

NOK 2 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 5 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号 6) であり、及び／または (3) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 7 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号 8) であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

8. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5046 として寄託されているハイブリドーマ NOK 3 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 9 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号 10) であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

9. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5047 として寄託されているハイブリドーマ NOK 4 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 11 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号 12) であり、及び／または (3) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 13 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号 14) であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

10. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5048 として寄託されているハイブリドーマ NOK 5 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 15 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号 16) であり、及び／または (3) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 17 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号

18) であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

また、本発明によれば、前記モノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、前記1～5のいずれか1項に記載のH鎖またはL鎖の超可変領域をコードする部分を少なくとも含むDNAまたはRNAが提供される。

さらに、本発明によれば、前記モノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、前記6～10のいずれか1項に記載のH鎖またはL鎖の可変領域をコードする部分を少なくとも含むDNAまたはRNAが提供される。

10 本発明によれば、前記6～10のモノクローナル抗体またはその活性フラグメントの変異体が提供される。これらの変異体の具体例としては、以下のものが例示される。

11. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 4として寄託されているハイブリドーマNOK1が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号19で表されるアミノ酸配列(DNA配列は、配列番号20)であり、及び/または(3) L鎖の可変領域が配列表の配列番号21で表されるアミノ酸配列(DNA配列は、配列番号22)であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメントの変異体。

12. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 5として寄託されているハイブリドーマNOK2が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号23で表されるアミノ酸配列(DNA配列は、配

列番号 24) であり、及び／または (3) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 25 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号 26) であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメントの変異体。

5 13. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5046 として寄託されているハイブリドーマ NOK3 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 27 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号 28) であり、及び／または (3) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 29 で表されるアミノ酸配列 (DNA 配列は、配列番号 30) であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメントの変異体。

また、本発明によれば、前記モノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、前記 11～13 のいずれか 1 項に記載の H鎖または L鎖の可変領域をコードする部分を少なくとも含む DNA または RNA が提供される。

#### 【実施例】

以下に実施例を挙げて、本発明についてより具体的に説明するが、  
20 本発明は、これらの実施例のみに限定されるものではない。

##### 〔実施例 1〕 モノクローナル抗体の作製及び特性化

###### (1) Fas リガンド遺伝子の単離

###### ① プライマーの調製

ヒト Fas リガンドの遺伝子は、Nagata et al. の  
25 報告をもとに単離した。すなわち、ヒト Fas リガンド cDNA の 5' 末端側では、Xho-I サイトの配列にヒト Fas リガンド 5

5' 末端の配列 18mer を付加した Xho I - 5' Fas L、ヒト Fas リガンド cDNA の 3' 末端側では、Not 1 サイトの配列にヒト Fas リガンド 3' 末端の配列 18mer を付加した Not 1 - 3' Fas L のそれぞれについて、モデル 392 DNA/RNA 5 シンセサイザー (ABI 製) を用いて 0.2 μmol のスケールで DNA 合成を行った。プロトコールに従い生成 DNA を精製して、PCR 用のプライマーとした。

## ② Fas リガンド cDNA の鋳型の調製

鋳型は、ヒト Fas リガンドを発現しているヒトキラー T 細胞から調製した。具体的には、ヒトキラー T 細胞を PMA とイオノマイシンで活性化し、この細胞を  $1 \times 10^7$  個回収した。回収した細胞は、RNazol B (コスモバイオ製) 1 ml に懸濁し、さらに 100 μl のクロロホルムを加えてよく混合した後、氷上にて 30 分間放置した。その後、15,000 rpm、15 分間の遠心分離 (4°C) 15 にて、フェノール層と水層とに分け、上層の水層のみを回収した。これに対して等量のイソプロパノールを加え、-80°C にて 30 分間放置し、遠心分離 (15,000 rpm、15 分間、4°C) で RNA を沈殿させた。この沈殿をエタノール 1 ml で 1 回遠心洗浄した後、DEPC 处理した水 11.5 μl に懸濁した。この RNA 液 11.5 μl に対し、合成のオリゴ dT を 0.5 μl (0.5 mg/ml) 加え、70°C にて 10 分間熱処理を行った。その後、氷上にて 5 分間処理した。

その後、5 × RT 緩衝液 (ストラタジーン製) 4 μl と 10 mM の dNTP 1 μl と 0.1 M DTT 2 μl と Superscript 25 RTase (ストラタジーン製) 1 μl とを加え、42°C で 50 分間反応させ、cDNA へと逆転写させた。90°C で 5 分間処理し、

R T a s e を失活させた後、氷上に 5 分間放置した。次に、このサンプルに R N a s e H (ストラタジーン製) 1  $\mu$  l を加え、さらに 37 °Cで 20 分間反応させて不要な RNA を分解した後、これを F a s リガンドを含む c D N A の鋳型とした。

5 ③ P C R

P C R は、 P C R 実験マニュアル (H B J 出版、 p. 75 ~ 85) を参考に、次の条件で実施した。

すなわち、②で作製した c D N A 2  $\mu$  l に対し、 10 mM の d N T P m i x (ファルマシア製) 1  $\mu$  l + X h o I サイト - 5' ヒト F a s L 1 8 m e r (50  $\mu$  M) 1  $\mu$  l + N o t I - 3' ヒト F a s L 1 8 m e r (50  $\mu$  M) 1  $\mu$  l + 10 × の P C R 緩衝液 (パーキンエルマー製) 4  $\mu$  l + A m p l i T a q T M (パーキンエルマー製) 0.5  $\mu$  l + 水 30.5  $\mu$  l でトータル 40  $\mu$  l にし、これにミネラルオイル (シグマ製) 40  $\mu$  l を重層した後、 P C R 用の D N A サーマルサイクラー (パーキンエルマー・ジャパン製) を用いて増幅反応を行った。具体的には、順次、 94 °C 5 分間、 55 °C 2 分間、 72 °C 3 分間、 94 °C 1 分間、 55 °C 2 分間、及び 72 °C 10 分間の条件で、かつ、 55 °C 2 分間と 94 °C 1 分間との間の処理を 30 回繰り返すことにより増幅反応を行った。

20 ④ P M K i t N e o ベクターへの組み込み

P C R にて増幅反応を行った後、フェノールとクロロホルムの混合液で水層のみを抽出した。この液に、 X h o I と N o t I (いずれもベンリンガー社製) 各 1.0 単位加え、付属緩衝液を添加後、 37 °C にて 16 時間反応した。この液について、 1 % アガロースゲル電気泳動を行った。 U V 照射のもとで、 F a s リガンドに相当する約 850 b p のバンドを切り出した。

このアガロースゲルから、GENECLEAN II キット (BIO101、フナコシ製) を用いて、DNAを抽出した。すなわち、付属のNaI液をゲルに加え、65℃で10分間インキュベートし、ゲルを溶かした後、これにグラスマイルク (glassmilk) を加え5分間5 ローテートし、DNAを吸着させた。このグラスマイルクをNew-WASH液で3回洗浄後、TE緩衝液10μlに懸濁し、65℃で3分間インキュベートすることによりDNAを溶出させた。

次に、PMKittNeoベクターも1μg分、同様に、XhoIとNotIで制限酵素処理を行い、0.75%アガロース電気泳動10 した後、GENECLEAN II キットを用いて精製した。

次に、FasリガンドcDNAとPMKittNeoベクターをライゲーションした。すなわち、ベクター:cDNA = 1:2 (モル比)になるように混合し、これに宝酒造製のDNAライゲーションキットを用いて、16℃にて16時間ライゲーション反応を行った。

#### 15 ⑤大腸菌への組み込み

前記④の反応液を、大腸菌コンピテントセル (東洋紡製) と混合して、氷上で30分間、42℃で40秒間インキュベートすることにより、DNAを大腸菌へ導入した。これに対し、SOC培地を加え、37℃で1時間振とう培養後、アンビシリン入りのLB寒天培地に20 分注し37℃にて1日間培養した。その後、出現したコロニーをLB培地で37℃1日間培養した後、アルカリ法にて、プラスミド (ヒトFasリガンド-PMKittNeo) を回収した。

#### (2) COS細胞への導入

プラスミド (ヒトFasリガンド-PMKittNeo) のCOS細胞 (ATCC CRL1650) への導入は、DEAE-デキストラン法 (実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ4、遺伝子導入25

と発現解析法、p. 16-22、1994、羊土社)により行った。  
すなわち、アルマシア製のDEAE-デキストランを用い、ヒトFas  
リガンド-PMK kit Neo 5  $\mu$ g /  $2 \times 10^6$  COS細胞の割合で  
DEAE-デキストラン法を実施し、Fasリガンド発現COS細  
5 胞を得た。

### (3) 免疫感作

前記(2)で調製したFasリガンド発現COS細胞の懸濁液をMPL  
1 pr / 1 pr マウス(メス、4週齢)の腹腔内に、 $1 \times 10^7$ 個  
(細胞) / 四の割合で注射した。次いで、1週間後から週1回の割  
10 合で合計3回、同一マウスにFasリガンド発現COS細胞の懸濁  
液を注射することにより、免疫感作した。

### (4) 細胞融合

最終免疫の3日後に、上記マウスから脾臓を取り出した。脾臓を細  
断後、メッシュで濾過し、RPMI 1640培地(日本製)に浮遊  
15 させ、脾細胞 $1 \times 10^8$ 個を得た。この脾細胞とマウス由来の8-ア  
ザグアニン耐性株(ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトラン  
スフェラーゼ欠損株) P3X63Ag8.653(ATCC CRL1580)  
( $1 \times 10^7$ 個)と約5:1の割合で混合し、遠心した(1500 rpm、  
5分間)。

20 得られた細胞のペレットに、50%ポリエチレンリコール4000  
(メルク製) / RPMI 1640溶液2mlを、37℃の温水中で  
搅拌しながら1分間を要して加えた。これにRPMI 1640液  
15mlを搅拌しながら6分間を要して加え、細胞融合を行った。  
融合後、大量(約40ml)のRPMI 1640液を加え、遠心分  
25 離(1500 rpm、5分)して上清を除去した。次いで、ヒポキ  
サンチン(100  $\mu$ M)、アミノブテリン(0.4  $\mu$ M)、チミジ

ン (10 μM) を含む 10% F C S (牛胎児血清) - R P M I 1 6 4 0 培地 (H A T 培地) にて、脾細胞が  $1 \times 10^6$  個 / ml になるように調製した。

(5) ハイブリドーマの選択

5 上記 (4) で調製した細胞浮遊液を 96 ウエルマイクロプレート 10 枚に  $200 \mu l$  ずつ分注し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下にある CO<sub>2</sub> インキュベータで細胞を培養した。1週間後には、ハイブリドーマのみがコロニーを形成して、増殖していることが確認できた。

(6) ハイブリドーマの選別

10 エフェクター分子として、Fas リガンドを発現した C O S 細胞の培養上清を使用し、かつ、ターゲットとして Fas 抗原を細胞表面に発現するトランスフェクタントを用い、C O S の培養上清中に存在する可溶性 Fas リガンド分子のトランスフェクタントに対するキラー活性をロックした培養上清のハイブリドーマを選別した。

15 ① 可溶性 Fas リガンド分子の調製

Fas リガンド分子は、Fas リガンド発現 C O S 細胞の培養上清に存在する可溶性 Fas リガンド分子を使用した。すなわち C O S 細胞に D E A E - デキストラン法にて Fas リガンド - P M K I T<sub>ne</sub> を導入後、10% F C S - D M E 培地 100 ml 分用いて 1 週間培養した後、その培養上清を回収した。これを 0.45 μm のフィルターで滅菌し、これを可溶性 Fas リガンド分子とした。

20 ② ターゲット細胞の調製

ターゲット細胞には、ヒト Fas 遺伝子を導入した W R 1 9 L 細胞を用いた。W R 1 9 L (A T C C T I B 5 2) へのヒト Fas 遺伝子の導入は、常法に従って行った。具体的には、H a n a b u c h i らの文献 (P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A, V o l.

91, No. 11, p. 4930 - 4934, 1994) を参考にして作製した。得られた Fas-WR19L 細胞を培養し、10% FCS・RPMI 培地にて  $2 \times 10^5$  個 / ml に調製した。

### ③ スクリーニングアッセイ

5 先ず、①で調製した可溶性 Fas リガンド分子を 10% FCS-DME 培地で 12 倍に希釈した。96 ウエル平底プレート（コーニング製）を用い、各ウエルに、この希釈液 25  $\mu$ l に対し、各ハイブリドーマの培養上清を 25  $\mu$ l 加え、37°C で 1 時間インキュベートした。この後、②で調製した Fas-WR19L 細胞を 50  $\mu$ l / ウエル 10 加え、37°C で 5% CO<sub>2</sub> の環境下のもと、12 時間インキュベートした。

次いで、Alamar Blue™アッセイキット（関東化学）を用いて生細胞率（抗体または Fas リガンドを入れていないコントロールを 100% とする）を測定し、可溶性 Fas リガンド分子による Fas-WR19L 細胞に対するキラー活性を阻害しているウエルのハイブリドーマを選択した。

### （7） クローニング

抗体産生細胞（ハイブリドーマ）を、限界希釈法により 1 個 / ウエルとなるように、96 ウエルマイクロプレートに分注し、培養した。 20 10 日間の培養後、シングルコロニーの増殖が確認できたため、再び、キラー活性のプロックによる抗体検出の操作を行った。その結果、Fas リガンドと特異的に反応するクローニングを得た。次いで、単一クローニングのハイブリドーマの培養上清液から抗体を回収することにより、目的とする Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を得た。

上記で得られたモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、

NOKと命名されて、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044 (NOK1) 、 FERM BP-5045 (NOK2) 、 FERM BP-5046 (NOK3) 、 FERM BP-5047 (NOK4) 、 FERM BP-5048 (NOK5) などとして寄託されている細胞株を例示することができる。

(8) モノクローナル抗体の特性化

特性化① (FasL発現細胞の染色)

得られたハイブリドーマの中で例えばNOK5の細胞株が產生する抗体が、細胞表面に発現するFasリガンドと反応することを、Fasリガンドを発現させたL5178Y細胞をもともとの親株であるL5178Y細胞 (ATCC CRL1723) と比較することで検討した。

ヒトFasリガンド遺伝子をL5178Yに導入する方法 (FasL-L5178Tの調製法) は、以下の通りである。

すなわち、PMK<sub>it</sub> Neoに組み込んだヒトFasリガンド遺伝子 1 μg に対し、XhoIとNotI (ベーリンガー製) の制限酵素を各1単位加え、付属緩衝液を添加後、37℃にて2時間反応させた。この液について、1%アガロースゲル電気泳動を行った。UV照射のもとでFasリガンドに相当する約850bpのバンドを切り出した。

このアガロースゲルから、GENECLEAN IIキット (BIO101、フナコシ製) を用いて、DNAを抽出した。すなわち、付属のNaI液をゲルに加え、65℃で10分間インキュベートし、ゲルを溶かした後、これにグラスマイルク (glass milk) を加え5分間ローテートし、DNAを吸着させた。このグラスマイルクをNew-WASH液で3回洗浄後、TE緩衝液 10 μl に懸濁し、65℃で

3分間インキュベートすることによりDNAを溶出させた。次に、  
B C M G S<sub>ne.</sub> のベクター 1  $\mu$ gについても同様に X h o I と N o t I  
で制限酵素処理を行い、0.75%アガロースゲル電気泳動を行った後、G E N E C L E A N I I キットを用いて精製した。

5 次に、F a s リガンド c DNA と B C M G S<sub>ne.</sub> ベクターのライゲー  
ションをベクター : c DNA = 1 : 2 (モル比) になるように混合  
し、宝酒造製DNAライゲーションキットを用いて、16°Cで16  
時間反応させて行った。

この反応液を、大腸菌コンピテンドセル(東洋紡製)と混合して、  
10 氷上で30分間、42°Cで40秒間インキュベートすることにより、  
DNAを大腸菌へ導入した。これに対し、S O C 培地を加え、37  
°Cで1時間振盪培養後、アンビシリソウ入りのL B 寒天培地に分注し  
37°Cにて1日間培養した。その後、出現したコロニーをL B 培地  
で37°C1日間培養した後、アルカリ法にて、プラスミド(ヒトF a s  
15 リガンド-B C M G S<sub>ne.</sub>)を回収した。

このヒトF a s リガンド-B C M G S<sub>ne.</sub> 1  $\mu$ gについて、L 5 1 7 8 Y  
細胞  $1 \times 10^6$ 個に対し、エレクトロポレーション法にて遺伝子導入  
を行った。条件は、ジーンパルサー(バイオラッド製)を用い、296V、  
960  $\mu$ Fにて実施した。この細胞を、再度10%F C S · R P M I 1 6 4 0  
20 培地5m lに懸濁した。6ウエルプレートにこの細胞の液を入れて  
培養を行ったが、このとき、G 4 1 8 (G I B C O製)を0.4mg  
/m lになるように培地に添加した。10日の培養後コロニーが得  
られたので、限界希釀法により細胞をクローニングした。得られた  
クローンについてノーザンハイブリダイゼーション法によりヒトF a s  
25 リガンドのm R N A が一番高いものについて選別し、培養した。こ  
れをF a s リガンド-L 5 1 7 8 Y細胞とした。

L 5 1 7 8 Y 細胞及び F a s リガンド - L 5 1 7 8 Y 細胞は、それぞれ P B S で  $1 \times 10^6$  個 / m l に調製した。チューブ（ファルコン N o . 2 0 0 8 ）にこの細胞を  $1 \times 10^6$  個ずつ入れた。次いで、ハイブリドーマ N O K 5 の培養上清  $1 0 0 \mu l$  を入れ、水上で 3 0 分間反応させた。次いで、 P B S で遠心洗浄（ 1 5 0 0 r p m 、 1 分間、 2 回）し、 F I T C - 抗マウス Ig's (コスモバイオ / カペル製)  $1 \mu l$  を加え、さらに氷上で 2 0 分間反応させた。反応後、 P B S で 2 回遠心洗浄を行い、 P B S  $2 0 0 \mu l$  に懸濁した後、 F A C S c a n にて測定した。

その結果、図 1 ~ 3 に示すように、 N O K 5 が産生する抗体は、 F a s リガンドを発現した L 5 1 7 8 Y 細胞には反応するが、親株の L 5 1 7 8 Y 細胞には反応しないことが明らかになった。即ち、図 2 と図 3 に示すように、親株の L 5 1 7 8 Y 細胞の染色パターンは、 N O K 5 抗体の添加の有無によって相違することはないが、図 1 に示すように、 F a s リガンド - L 5 1 7 8 Y 細胞の染色パターンは、 N O K 5 抗体の添加の有無によって明瞭に相違している。

N O K 1 ないし N O K 4 の細胞株を用いて、前記 N O K 5 の場合と同様の結果を得た。

#### 特性化②（サブクラスの測定）

N O K 1 ないし N O K 5 のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体について、サブクラスを測定した。

サブクラスの測定は、 M A B タイピングキット（ P h a r M i n g e n 社製）を用い、付属のプロトコールに従い測定したところ、それぞれ、 N O K 1 は、マウス Ig G<sub>1</sub> 、 N O K 2 は、マウス Ig G<sub>2a</sub> 、 N O K 3 は、マウス Ig M 、 N O K 4 は、マウス Ig G<sub>3</sub> 、 N O K 5 は、マウス Ig G<sub>2a</sub> であった。

特性化③

前記したとおり、Alamar Blue™アッセイキット（関東化学）を用いて生細胞率を測定し、可溶性Fasリガンド分子によるFas-WR19L細胞に対するキラー活性を阻害しているウエルのハイブリドーマを選択したが、NOK1～NOK5のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体は、下表に示すごとく、前記（6）①～③に記載の方法で実施すれば、可溶性FasリガンドによるFas-WR19L細胞に対するキラー活性を、90%以上、好ましくは98%以上の高率で阻害する。すなわち、これらの抗体のアポトーシス抑制率は、90%以上、好ましくは98%以上である。

表2

クローン	生存率
抗体無添加	3.5%
NOK1培養上清添加	99.3%
NOK2培養上清添加	105.2%
NOK3培養上清添加	101.0%
NOK4培養上清添加	109.8%
NOK5培養上清添加	98.2%

20 [実施例2] モノクローナル抗体の特性化

ハイブリドーマNOK1～NOK3が分泌する各モノクローナル抗体の特性について、以下の方法により更に検討した。

(1) 精製抗体の調製

①ハイブリドーマNOK1～NOK3をそれぞれ10%FCS入りRPMI1640培地で $3 \times 10^7$ 個まで増殖させた。 $3 \times 10^7$ 個の細胞は、75cm<sup>2</sup>フラスコ（ファルコン製）に30ml培養液を入

れて細胞培養を行うスケールで調製した。具体的には、 $2 \times 10^6$  個／m<sup>1</sup> の濃度で培養を始め、 $1 \times 10^6$  個／m<sup>1</sup> になるとき細胞を回収した。

②回収したハイブリドーマは、NOK1～NOK3のいずれにおいても 1.5 m<sup>1</sup> の PBS に懸濁し、ヌードマウスに対し、0.5 m<sup>1</sup> (1 × 10<sup>7</sup> 個相当分) 腹腔内投与した。10日間の飼育の後、腹腔内にたまつた腹水を回収した。

③回収した腹水は、NOK1で 6.9 m<sup>1</sup>／匹、NOK2で 6.7 m<sup>1</sup>／匹、NOK3で 7.4 m<sup>1</sup>／匹であった。このうち、それぞれ 10 m<sup>1</sup> を用い精製を行った。

④精製は、それぞれ 10 m<sup>1</sup> (等量) の飽和硫酸アンモニウムを滴下し、腹水と混合する硫安塩析から始めた。4℃にて 2 時間攪拌後、10,000 g で 15 分間遠心分離を行った。上澄みを捨てた後、沈殿したものを 5 m<sup>1</sup> の PBS にて溶解させた。その後、PBS 3 リットルにて 1 昼夜透析した。

⑤NOK1 及び NOK2 については、透析サンプルを回収後、Protein G カラム (ファルマシア製) を用いて、FPLC システムにて Protein G 吸着 IgG のみを精製した。このサンプルをさらに PBS にて透析を一昼夜行った。翌日に蛋白質濃度の定量及び純度の検定を行った。NOK3 については、透析サンプルを回収後、ゲルろ過用の Superdex 200 (ファルマシア製) カラムを用いて FPLC システムにて、ゲルろ過し、void volume に出てくる IgM を回収した。この回収した IgM についても、蛋白質の定量及び純度の検討を行った。

蛋白質の定量は、バイオラッド製の蛋白質定量試薬を用いて測定し、純度の検定は、SDS 電気泳動を還元条件にて行い調べた。そ

の後、NOK1～NOK3抗体を1mg/mlにPBSにて調製後、0.2μmのフィルターを用いて滅菌した。

#### (2) 細胞障害反応

##### ① 可溶性Fasリガンド分子の調製

5 Fasリガンド分子としては、Fasリガンド発現COS細胞の培養上清に存在する可溶性Fasリガンド分子を使用した。すなわち、COS細胞にDEAE-デキストラン法にてFasリガンド-PMKit Neoを導入後、10%FCS-DME培地100ml分用いて1週間培養した後、その培養上清を回収した。これを0.10 45μmのフィルターで滅菌し、これを可溶性Fasリガンド分子とした。

##### ② Fasリガンドに対する抗体の調製

前述のNOK1～NOK3が產生した各抗体に関し、10%FCS-RPMI1640培地で13種類の濃度のものを作製した。抗体の濃度は、それぞれ32μg/ml、16μg/ml、8μg/ml、4μg/ml、2μg/ml、1μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.125μg/ml、0.0625μg/ml、0.03125μg/ml、0.015625μg/ml、0.0078125μg/mlのものを1mlずつ作製した。

20 なお、これらの抗体は、それぞれ100μlの反応系に1/4容量の25μlを入れるため、最終的な実効濃度は1/4の濃度となる。

##### ③ Fas-Igの調製

25 Fas-Igのつくり方は、本発明者である八木田、奥村らの文献(Hanabuchi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, No. 11, p. 4930-4934,

1994) に詳細に述べられている。今回は、これと同じものを用いた。

すなわち、FasのcDNAについて、細胞外ドメインにあたる部分の両端の配列をPCRプライマーとした。このプライマーをもとにFasの細胞外ドメインをPCRにて増幅し、ヒト免疫グロブリンIgGのFcが入ったベクターpBluecript IIにサブクローニングした。その後、このベクターからFas-Igのフラグメントを回収し、CDM8の発現ベクターに組み込んだ。このFas-Ig/CDM8ベクターをCOS細胞に導入して、培養を行い、約10日後、培養上清を回収した。この培養上清をProtein Aセファロースビーズのカラム(ファルマシア製)を用いて精製した。PBSにて透析後1mg/mlに調製し、0.2μmのフィルターで滅菌した。これについても、10%FCS-RPMI1640で、Fasリガンドに対する抗体NOK1~NOK3と同様に、32μg/ml~0.0078125μg/mlの範囲内の13種の濃度に調製した。

#### ④ターゲット細胞の調製

ターゲット細胞には、ヒトFas遺伝子を導入したWR19L細胞を用いた。WR19L(ATCC TIB52)へのヒトFas遺伝子の導入は、常法に従って行った。具体的には、本発明者である八木田、奥村らの文献であるHanabuchiらの文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, No. 11, p. 4930~4934, 1994)を参考にして作製した。得られたFas-WR19L細胞を培養し、10%FCS-RPMI培地にて $2 \times 10^6$ 個/mlに調製した。

#### ⑤細胞障害反応

まず、①で調製した可溶性 Fas リガンド分子を 10% FCS - DME 培地で 12 倍に希釈した。96 ウエル平底プレートを用い、各ウエルにこの希釈液 25  $\mu$ l を入れた。次いで、Fas リガンドに対する抗体 NOK1 ~ NOK3 及び Fas - Ig のそれぞれの濃度の液を 3 ウエルずつに 25  $\mu$ l / ウエルの割合で加えた。その後、37 °C で 5% CO<sub>2</sub> のもと 1 時間インキュベートした。この後、④で調製した Fas - WR19L 細胞を 50  $\mu$ l / ウエル加え、37 °C で 5% CO<sub>2</sub> のもと 12 時間インキュベートした。次いで、アラマーブルー (Alamar Blue<sup>TM</sup>、コスモバイオより購入) を 1 / 10 vol 10  $\mu$ l 入れて、さらに 37 °C で 5% CO<sub>2</sub> のもと 4 時間インキュベートした。その後、フルオロスキャン II (タイタック製) 蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、蛍光を測定した。

なお、可溶性 Fas リガンドも抗体も Fas - Ig も入れずに、Fas - WR19L 細胞 50  $\mu$ l / ウエルに対し、10% FCS - RPMI 1640 培地 50  $\mu$ l / ウエル入れたものを 100% 生存のコントロールとし、可溶性 Fas リガンド 25  $\mu$ l に 10% Fcs - RPMI 1640 25  $\mu$ l、Fas - WR19L 50  $\mu$ l 入れたものをアポトーシスのコントロールとした。その結果を図 4 に示す。

この図 4 に示すように、モノクローナル抗体 NOK1 ~ NOK3 のいずれも、濃度依存的に可溶性 Fas リガンドが持つ Fas 発現細胞に対するアポトーシス誘導活性を中和 (抑制) することが実証できた。しかも、その抑制効果は、図 4 から、本発明のモノクローナル抗体は、0.01 ~ 8  $\mu$  / ml の濃度 (実効濃度) において、Fas - Ig キメラ分子に比べて高いアポトーシスの抑制活性を示すことがわかる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体が Fas - Ig

よりも Fas に対するアフィニティーが強く、より有効であることが実証できた。

このことは、生体内でもモノクローナル抗体NOK1～NOK3のいずれかが存在すれば、FasリガンドとFasが結合するよりも、  
5 Fasリガンドとこれらのモノクローナル抗体が結合することから、FasとFasリガンドの生理的反応を十分抑制できることが容易に推察される。

#### [実施例3] Fasリガンド分子の免疫沈降

得られたFasリガンドに対するモノクローナル抗体が、Fas  
10 リガンド分子を免疫沈降できるか否かを確認した。

①ヒトのFasリガンドを導入したFasリガンド-L5178Y細胞を $1 \times 10^6$ 個/m<sup>3</sup>の濃度になるように、システインとメチオニンを含まない10%FCS・DME培地1mLで調製した。この細胞液に<sup>35</sup>S-Cys/Met(トランスラベル; INC 15 Biomedical Inc 製)を3.7MBq/mLになるように加え、24ウエルのプレートで37℃にて16時間培養した。その後、培養上清を回収するとともに、細胞にはシステインとメチオニンを含む通常の10%FCS・DME培地を入れ、さらに4時間培養した。

20 ②細胞を回収した後、1mLの細胞溶解液(0.5%トリトンX-100、20mM Tris-HCl pH 7.6、150mM NaCl、10μM PMSF、50μg/mLのトリプシンインヒビター)を加え、細胞を溶解させた。溶解は、氷上で1時間放置して行い、その後15,000rpm、15分間の遠心分離により、  
25 可溶化した細胞溶解液の上清を回収した。

①の培養上清と②の細胞溶解液に対し、コントロールとして、まず、

マウスの IgG を結合させたセファロースビーズでプレクリアを行った。すなわち、IgG 結合セファロースビーズ 100 μl を加え、4℃にて 16 時間反応させ、ビーズを遠心分離で除去することにより IgG に非特異的に結合する物質をとり除いた。

5 次いで、NOK1 の精製抗体と結合させたセファロースビーズを 100 μl (ビーズは 50 μl 分) 加え、さらに 4℃にて 16 時間反応させた。遠心分離によりビーズに非吸着の部分を除去し、さらに、このビーズを細胞溶解液で 2 回遠心洗浄した。このビーズに対し、20 μl の SDS-PAGE 用の還元用サンプルバッファーを入れ、5 分間煮沸した。その後 10% から 20% の濃度勾配ゲルを用いて電気泳動を行った。泳動後ゲルを取り出し、Amplify™ (Amersham Japan 製) で、30 分間インキュベートした。その後ゲルを乾燥し、X 線フィルムで露光させた。その結果、図 5 に示すように、細胞 (Cell) からは約 40 kDa の膜型 Fas リガンド分子を、15 細胞の培養上清 (Sup) からは約 27 kDa の可溶性 Fas リガンド分子を検出した。比較対象として、NOK1-セフィロースビーズに代えて、コントロールマウス IgG-セファロースビーズ (c Ig) を用いると何も検出できなかった。この結果、モノクローナル抗体 NOK1 は、Fas リガンド分子を免疫沈降できることがわかった。

20 [実施例 4] 可溶性 Fas リガンドの定量

Fas リガンド抗体を組み合わせることで、可溶性 Fas リガンドが定量できるか否かを検討した。

① 可溶性 Fas リガンドの調製

ヒト Fas リガンド-L5178Y 細胞を、無血清培地 Excel 300™ (JRH Biociences 製) にて大量に培養した。具体的には、 $1 \times 10^6$  個 / ml の Fas リガンド-L5178Y 細胞を 1

リットルのカルチャーバック（セキスイ製）30個を用い、合計30リットル培養した。培養は5日間行い、その後1,000g、15分間の遠心分離により培養上清を回収した後、Minitan™（ミリポア製）を用いて300mlに濃縮した。この濃縮したFasリ5 ガンドーL5178Y培養上清をNOK1-セファロースビーズを用いたカラムにて精製した。精製はカラムをFPLCに接続し、300mlの濃縮培養上清を吸着後、よくカラムを洗浄し、0.1Mのグリシン-塩酸pH3.0にて溶出した。これについてPBSを透析後、一部をSDS-PAGEし、ゲルを銀染色して、単一バンドである10 ことを確認した後、バイオラッドのプロテインアッセイ液で、蛋白質量を測定した。今回の培養により10μgの可溶性Fasリガンドを得た。これをスタンダードの可溶性Fasリガンドとした。

## ② NOK1のビオチン化

モノクローナル抗体NOK1をビオチンでラベルした。方法は、常15 法に従い実施した。すなわち、10mg/mlにPBSで調製したモノクローナル抗体NOK1を0.1Mの炭酸緩衝液pH9.2に透析し、バッファー交換した。

この抗体液1mlに対し1mgのNHS-LC-Biotin（ピ20 アス社製）を同炭酸緩衝液1mlに溶かしたものを0.2ml加え、室温で1時間反応させた。これをPBSにて1昼夜透析した。これをビオチン化モノクローナル抗体NOK1として用いることにした。

## ③ サンドイッチELISA（可溶性Fasリガンドの定量）

可溶性Fasリガンドの定量は、以下に述べるサンドイッチELISAのプロトコールにて実施した。サンプルは、可溶性Fasリガンド25 分子を用いて、スタンダードな標準曲線を作成した。

1) 96ウェルELISAプレート（住友ベークライト製No. MS

– 8 9 9 6 F) に対し、50  $\mu$  l / ウエルの割合で、NOK3 抗体を（精製抗体を 10  $\mu$  g / ml を PBS で希釈したもの）加えた。

このプレートについて、4 °C で 16 時間放置しモノクローナル抗体 NOK3 をプレート底面に固定した。なお、37 °C で 4 時間放置し、

5 モノクローナル抗体 NOK3 をプレート底面に固定してもよい。

2) 固定に用いた NOK3 の溶液を捨てて、2 倍に PBS で希釈したブロックエース（大日本製薬製）を 200  $\mu$  l / ウエルで分注し、ブロッキングを行った。この処理は、37 °C で 2 時間放置することで行った。

10 3) ブロッキングに用いた液を捨て、可溶性 Fas リガンド液をそれぞれ 7 ng / ml 、 3.5 ng / ml 、 1.75 ng / ml 、 0.875 ng / ml 、及び 0.4325 ng / ml の濃度に合わせ、各 50  $\mu$  l / ウエルずつ分注した。その後、室温で 1 時間反応した。

15 4) 1 時間後、0.05% のツイーン 20 が入った PBS でプレートを 5 回洗浄した後、5  $\mu$  g / ml に 5% のマウスの血清を含む 0.05% のツイーン 20 入り PBS で希釈したビオチン化モノクローナル抗体 NOK3 を 50  $\mu$  l / ウエル分注し、さらに、室温で 1 時間反応させた。

20 5) 同様に 0.05% ツイーン 20 入り PBS で 5 回洗浄後、150 倍に 0.05% ツイーン 20 入り PBS で希釈した AB Complex 液（ベクター社製）を 50  $\mu$  l / ウエル分注し、さらに、室温で 1 時間反応させた。

25 6) 0.05% ツイーン 20 入り PBS で 5 回洗浄後、1 mg / ml のオルトフェニレンジアミン（和光純薬製）、及び 0.03% の過酸化水素水（和光純薬製）が入った 0.1 M クエン酸 – リン酸ナトリウム (pH 5.0) 緩衝液 100  $\mu$  l / ウエル入れ、室温で約 20

分間反応させた。

7) その後、100  $\mu$  l／ウェル 2Nの硫酸を入れて、反応を停止し、490 nmでの吸光度値をマイクロプレートリーダー（バイオラッド製）にて測定した。

5 その結果、可溶性Fasリガンドを定量することができた。そのときの標準曲線を図6に示す。

この図6に示すように、この方法では、少なくとも7 ng/mlから0.4325 ng/mlの可溶性Fasリガンドを検出することができることがはじめて明らかになった。

10 [実施例5] 血清中のFasリガンドの定量

実施例4のサンドイッチELISAのプロトコールを用いて、実際に以下に述べる疾患の血清を用いて血清中のFasリガンドを定量した。方法は、実施例4の③の3)にて、可溶性Fasリガンドのスタンダード、IM（伝染性単核球症）、SLE（全身性エリテマトーデス）、apla（再生不良性貧血）、GVHD（対宿主性移植片病）、VAHS（ウイルス関連血球貧食症候群）、肝炎、及び健常人の血清を用いて測定し、可溶性Fasリガンドの標準によりそれぞれの血清中のFasリガンドを定量した。結果を図7に示す。

20 図7から、IM、SLE、肝炎において、本方法により健常人より血清中のFasリガンドが高いことがわかり、これらの疾患の診断が本方法で行えることがはじめて明らかになった。

[実施例6] サルFasリガンドとの反応性の検討

25 アカゲザルよりヘパリン添加注射筒を用い、末梢血5 mlを採血した。PBSにて2倍に希釈した後、セパレートLを用いて、リンパ球分画を比重遠心分離法にて回収した。このサルの末梢血単核球リンパ球をConA 10  $\mu$ g/ml入った10%FCS・ RPMI 1640

培地で 2 日間培養し、活性化を行った。その後、遠心分離により細胞を回収後、ヒト IL-2 (インターロイキン-2) が 50 units / ml 入った 10% FCS・RPMI 1640 培地にてさらに 1 週間培養した。1 週間後、PMA 10 ng / ml、及びイオノマイシン 500 ng / ml になるように添加し、さらに 4 時間活性化させた。このとき BB94 (マトリクスプロテアーゼインヒビター) を 10 μM の割合で同時に添加した。これらの活性化により該リンパ球に Fas リガンドを大量に発現させた。4 時間後細胞を回収し、フローサイトメトリーにて解析した。まず細胞を回収後、細胞数を 10 カウントし、PBS にて  $1 \times 10^6$  個 / ml にした後、チューブ (ファルコン No-2008) に 1 ml ずつ入れた後、コントロール PBS 100 μl、NOK1 抗体 1 μg (10 μg / μl の濃度になるように PBS に希釈したものを 100 μl)、モノクローナル抗体 NOK2 も 1 μg (10 μg / ml で 100 μl)、モノクローナル抗体 NOK3 も 1 μg (10 μg / ml で 100 μl) で入れ、氷上で 30 分間 15 反応させた。

PBS による遠心洗浄を 2 回行った後、PE-抗マウス Ig's を 1 μl 入れさらに氷上で 30 分反応させ、PBS 洗浄を行い PBS 200 μl に懸濁した後 FACS scan にて解析した。

20 その結果、図 8 に示すとく、モノクローナル抗体 NOK1～NOK3 のいずれも、蛍光強度 (横軸) がコントロールとは違う箇所にピークが見られる。すなわち、各抗体がサルの細胞表面の Fas リガンドと反応することが明らかとなった。

#### [実施例 7] マウス Fas リガンドの作用に対する抑制効果

25 ヒト Fas リガンドを遺伝子導入した細胞 hFasL / L5178Y のかわりに、マウス Fas リガンドを遺伝子導入した細胞 mFasL

／L 5 1 7 8 Yを用いて検討した。 $^{51}\text{Cr}$ を用いた細胞障害反応試験法を用いて行った。そのプロトコールを以下に示す。

①エフェクター細胞の調製

h F a s L／L 5 1 7 8 Y及びm F a s L／L 5 1 7 8 Y (h F a s L  
5 /L 5 1 7 8 Yと同様の方法で調製)のそれぞれを培養中のフラスコより回収し、10% F C S · R P M I 1 6 4 0 培地で、 $1 \times 10^6$ 個／m l にした。

②ターゲット細胞の調製

ヒト F a s 遺伝子を導入したh F a s /W R 及びその親株である W R について、 $5 \times 10^6$ 個／m l で $100 \mu\text{l}$ に10% F C S · R P M I 1 6 4 0 培地で調製した。次いで、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (I C N 製) 3. 7 M B q 分 (3 7 M B q /m l で $100 \mu\text{l}$ 分) 加え、37°Cにて1時間インキュベーションした。その後10% F C S - R P M I 1 6 4 0 培地で3回遠心洗浄した後、 $1 \times 10^5$ 個／m l に同培地で希釈した。

③細胞障害反応

9 6 ウエル・マルチプレート U 底 (コーニング製) にエフェクター細胞を $100 \mu\text{l}$ ／ウエル入れた。次いで、ハイブリドーマ N O K 1 ~ N O K 3 の培養上清を F a s リガンドに対する各モノクローナル抗体として用い、これらを $40 \mu\text{l}$ ／ウエル入れた。比較対照として抗体を入れないものを用いた。100% 生存と100% 死滅のコントロールを行うため、エフェクター細胞を入れず、培地を $100 \mu\text{l}$ ／ウエル入れたものを6 ウエルつくった。次いで、各ウエルにターゲット細胞を $100 \mu\text{l}$ ／ウエルで加えた。先ほどの100% 死滅には、さらに10% S D S を $20 \mu\text{l}$ 入れた。

25 その後、6 時間反応 (37°C デ 5% CO<sub>2</sub> インキュベート) を行った後、プレートを遠心分離し、細胞をウェル底面に沈殿させた。上

清液を  $100\mu\text{l}$  ずつ回収し、 $\gamma$ 線シンチレーションカウンター（ファルマシア製）にて上清中に遊離した $^{61}\text{Cr}$ のカウントを求めた。その測定結果を図9に示す。なお、10% SDSを入れたウェルの平均を100%死滅、ターゲット細胞のみのところを100%生存として、キラー活性（細胞障害）を求めた。その結果、モノクローナル抗体NOK1～NOK3で代表されるヒトFasリガンドに対する抗体は、ヒトFasリガンドの作用は阻害するが、マウスFasリガンドの作用を阻害しないことがわかった。

#### [実施例8] 抗FasL抗体のV領域遺伝子シーケンス（その1）

ハイブリドーマNOK1～5を用いて、下記のプロトコールによりFasリガンドに対するモノクローナル抗体の可変領域（V領域）の遺伝子シーケンスを行った。

##### 1. cDNAの調製

(1) ハイブリドーマNOK1～5のそれぞれを  $25\text{cm}^2$  フラスコ中で培養した。培養細胞を回収して、PBSで遠心洗浄した後、 $1\text{ml}$  のPBSに懸濁し、細胞数を数えた。細胞  $1 \times 10^6$  個を無菌のエッペンドルフチューブに入れ、遠心分離で上清を抜き取り、ペレットをタッピングした。

(2) RNAzol B（コスモバイオ製）を  $200\mu\text{l}$  加え、ピペットマンのチップでよく攪拌して細胞を溶かした。クロロホルムを  $20\mu\text{l}$  添加し、振盪後、氷中に5分間放置した。4°Cで  $15,000\text{rpm}$ 、15分間遠心した後、上層の無色透明の部分を回収し、新しいチューブに移した。4°Cで  $15,000\text{rpm}$ 、15分間遠心した後、上清を捨てて、ペレットに75%エタノールを  $800\mu\text{l}$  加え、-20°Cで30分間放置した。4°Cで  $15,000\text{rpm}$ 、15分間遠心した後、ペレットに蒸留水  $11.5\mu\text{l}$  添加した。

(3) オリゴ d T (0.5 mg/ml) を 0.5  $\mu$ l 添加して、70  $^{\circ}$ C で 10 分間、氷上で 5 分間放置した。

表3

5	5 $\times$ RT buffer	4 $\mu$ l
	10 mM dNTP mix	1 $\mu$ l
	Superscript RTase	1 $\mu$ l
	(Stratagene 製)	

10 を加え、42  $^{\circ}$ C で 50 分間、90  $^{\circ}$ C で 5 分間、氷上で 5 分間放置した。

(4) RNase H を 1  $\mu$ l 添加し、37  $^{\circ}$ C で 20 分間放置した。  
このようにして、cDNA 混合物を調製した。

## 2. PCR 反応

15 (1) 前記で得られた cDNA を用い、下記の条件で PCR 反応を行った。

表4

		VH	VL
	cDNA	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
20	dNTP mix	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
	primer	2 $\mu$ l	1 $\mu$ l
	(Pharmacia 製)		
	10 $\times$ PCR buffer	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
	DDW	30.5 $\mu$ l	31.5 $\mu$ l
	Amplicon Tag	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l

25

ミネラルオイル 40  $\mu$ l を重層し、94  $^{\circ}$ C で 5 分間放置した後、

「55℃で2分間、72℃で3分間、94℃で1分間」のサイクルを30サイクル行い、次いで、55℃で2分間、72℃で10分間放置した。

(2) 反応液4μlをミニゲル電気泳動(1.5%アガロースゲル)

5 でチェックした。結果を図10に示す。モノクローナル抗体NOK3のL鎖を除いて、PCRによりDNA断片が増幅したことが確認された。

### 3. VH及びVLフラグメントの回収

(1) 上記で調製したPCR生成物をミニゲル電気泳動(1.5%

10 アガロースゲル)させて、VH(H鎖V領域)及びVL(L鎖V領域)のバンドをゲルから切り出した。

(2) Gene CleanでPCR生成物を回収し、ミニゲル電気泳動(1.5%アガロースゲル)でバンドをチェックした。例として、NOK4のVHについての結果を図11に示す。

### 15 4. ライゲーション

下記TAクローニングキットを用い、DNAの連結反応(Ligation)を行った。

表5

ADDW	5 μl
10×Ligation buffer	1 μl
PCRベクター	2 μl
PCR生成物	1 μl
T4DNA Ligase	1 μl

14℃で一晩反応を行い、ライゲーション混合物を得た。

### 25 5. トランスフォーメイション

TAクローニングキットを用いて形質転換(Transformation)

を行った。

(1) 氷上で細胞  $50 \mu l$  に、  $0.5 M$  の  $\beta$  メルカプトエタノール  $2 \mu l$  、及び前記で調製したライゲーション混合物を添加し 30 分間放置した後、  $42^\circ C$  の湯浴中に 30 秒間、次いで、氷上に 20 分間放置した。  $450 \mu l$  の SOC 培地を加え、  $37^\circ C$  で 1 時間 (225 rpm) インキュベートした。

(2) 次いで、 LB agar プレート (+Amp, X-Gal, IPTG) に拡散した。各サンプルは、  $50 \mu l$  、  $100 \mu l$  、  $200 \mu l$  であった。  $37^\circ C$  で 18 時間インキュベートした後、  $4^\circ C$  で 2 時間放置したところ、白と青のコロニーが発現した。

#### 6. ミニ培養 (Mini Culture)

(1) 前記各サンプルのプレートから白いコロニーを 4 個ずつ拾った。

(2)  $3 ml$  の LB 培地 (+Amp) に 1 個のコロニーを加え、  $37^\circ C$  で一晩振盪した。

#### 7. ミニ調製 (Mini Preparation)

(1) 培養溶液  $1.5 ml$  をエッペンドルフチューブに取った。(保存用として LB プレートに拡散して  $37^\circ C$  で培養した。)  $4^\circ C$  で 6, 000 rpm、 2 分間遠心した。

(2) ppt. +  $100 \mu l$  溶液 1 (リゾチーム  $5 mg/ml$  ) を加え、室温で 5 分間放置した後、  $200 \mu l$  の溶液 2 (氷上で穏やかに 5 分間混合) を添加し、  $150 \mu l$  の溶液 3 (氷上で 15 分間混合) を添加し、次いで、  $4^\circ C$  で 12, 000 rpm、 5 分間遠心した。

(3) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等容量のフェノールを添加し、次いで、室温で 12, 000 rpm、

1分間遠心した。

(4) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等容量の C H C l<sub>3</sub> : i A A (99 : 1) 混合物を加え、室温で 12, 000 r p m、1分間遠心した。

5 (5) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、1  $\mu$  l の M u s s e l グリコーゲンと 900  $\mu$  l のエタノールを添加し、-80°Cで30分間放置した後、4°Cで15, 000 r p m、5分間遠心した。

10 (6) 沈殿物を乾燥した。20  $\mu$  l の T E 及び 1  $\mu$  l の R N a s e A (5 mg / ml) を加え、65°Cで20分間放置した。

(7) このようにして、プラスミド D N A を得た、

(8) 下記の条件でミニゲル電気泳動を行い、バンドをチェックした。NOK4V<sub>L</sub>、NOK5V<sub>H</sub>、NOK5V<sub>L</sub>の結果を図12に示す。

表6

15	H B u f .	1 $\mu$ l
	E c o R I	1 $\mu$ l (IU)
	D N A	1 $\mu$ l
	A D D W	7 $\mu$ l

20 37°Cで1時間インキュベートした後、0.75%アガロースゲルに加えて電気泳動を行った。

#### 8. D N A シーケンス

(1) プラスミド D N A を 1  $\mu$  l とり、99  $\mu$  l の T E にて希釈した。

25 (2) A 260 を測定し、D N A 値を計算した (A 260 of 1.0 = 50  $\mu$  g / ml)。

(3) A<sub>260</sub> 値より、DNAが1 μg/μlとなるようにTEにて希釈した。(4) Dyeターミネーター法により、DNAシークエンス(オートシーケンサ；ABIモデル373Aを使用)を行った。

### 9. V領域の解析

5 このようにして得られたDNAシークエンスをもとに、V領域のアミノ酸配列をコンピュータ解析により求めた。結果を図13(モノクローナル抗体NOK1～5のVH領域のアミノ酸配列)、及び図14(モノクローナル抗体NOK1、2、4、5のVL領域のアミノ酸配列)に示す。これらの図において、四角の線で囲った箇所は、  
10 超可変領域(CD1～3)である。

### [実施例9] 抗FasL抗体V領域遺伝子シークエンス(その2)

ハイブリドーマNOK1～3に関して、実施例8とは別のPCR用プライマーを用いてV領域の遺伝子シークエンスを行った。

#### 1. cDNAの調製

15 (1) ハイブリドーマNOK1～3それぞれを25cm<sup>2</sup>フラスコ中で培養した。培養細胞を回収して、PBSで遠心洗浄した後、1mlのPBSに懸濁し、細胞数を数えた。細胞1×10<sup>6</sup>個を無菌のエッペンドルフチューブに入れ、遠心分離で上清を抜きとり、ペレットをタッピングした。

20 (2) この細胞のペレットから、ISOGENキット(ニッポンジーン製)を用いて、total RNAを調製し、さらに、このtotal RNAをPoly(A) Quick Kit(ストラタジーン製)を用いて、mRNAにまで精製した。

(3) 次いで、オリゴ-dT法により、cDNAに合成した。この過程は、First Strand cDNA Synthesis kit(ファルマシア製)を用いて、cDNAに合成した。

2. P C R 反応

上記で得られた c D N A を用い、下記の条件にて P C R 反応を行った。 V H 、 V L ともにプライマー以外は、同じ条件にて行った。 V H の P C R には V H を増幅するのに適したプライマーを用い、一方、 V L の増幅には、 V L を増幅するのに適したプライマーを用いて行った。

表7

	c D N A	5 $\mu$ l
	dNTPmix (25mM each)	1 $\mu$ l
10	プライマー mix (50pmol/ $\mu$ l)	
	アンチセンスプライマー	1 $\mu$ l
	センスプライマー	1 $\mu$ l
	10 × PCR buffer	10 $\mu$ l
	Takara EX Taq (5u/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
	DW	81.5 $\mu$ l
15	total	100 $\mu$ l

これにミネラルオイル 100  $\mu$  l を重層し、95 °C で 1 分間放置した後、「60 °C で 2 分間、72 °C で 2 分間、94 °C で 1 分間」のサイクルを 35 サイクル行い、 P C R 反応を行った。

20 なお、プライマーは、下記の資料をもとに D N A 合成機にて調製した。

E. A. Kabat らの抗体可変領域遺伝子の分類 (Sequences of Proteins of Immunological Interest 4th ed., Public Health Service, N H I, Washington D C, 1987) に基づいて、可変領域の上流にあるリーダー領域内に新たにセンス

プライマーをデザインした。アンチセンスプライマーは、D. M. Weirらの著書 (HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY VOLUME 3: GENETICS AND MOLECULAR IMMUNOLOGY) に記載され 5 ているマウス抗体定常領域の遺伝子配列を参照し、定常領域内にデザインした。

### 3. VH及びVLフラグメントの回収

(1) 上記で調製したPCR生成物をミニゲル電気泳動 (1. 5% アガロースゲル) させて、VH (H鎖V領域) 及びVL (L鎖V領域) のバンドをゲルから切り出した。 10

(2) Gene CleanでPCR生成物を回収し、ミニゲル電気泳動 (1. 5% アガロースゲル) でバンドをチェックした。

### 4. ライゲーション

下記TAクローニングキットを用い、DNAの連結反応 (Ligation) 15 を行った。

表8

ADDW	5 $\mu$ l
10 × Ligation buffer	1 $\mu$ l
PCRベクター	2 $\mu$ l
PCR生成物	1 $\mu$ l
T4DNA Ligase	1 $\mu$ l

14°Cで一晩反応を行い、ライゲーション混合物を得た。

### 5. トランスフォーメイション

TAクローニングキットを用いて形質転換 (Transformation) 25 を行った。

(1) 氷上で細胞 50  $\mu$  l に、0. 5 M の  $\beta$  メルカプトエタノール

2  $\mu$  l、及び前記で調製したライゲーション混合物を添加し30分間放置した後、42°Cの湯浴中に30秒間、次いで、氷上に20分間放置した。450  $\mu$  lのSOC培地を加え、37°Cで1時間(225 rpm)インキュベートした。

5 (2) 次いで、LB agarプレート(+Amp, X-Gal, IPTG)に拡散した。各サンプルは、50  $\mu$  l、100  $\mu$  l、200  $\mu$  lであった。37°Cで18時間インキュベートした後、4°Cで2時間放置したところ、白と青のコロニーが発現した。

#### 6. ミニ培養 (Mini Culture)

10 (1) 前記各サンプルのプレートから白いコロニーを4個ずつ拾った。

(2) 3mlのLB培地(+Amp)に1個のコロニーを加え、37°Cで一晩振した。

#### 7. ミニ調製 (Mini Preparation)

15 (1) 培養溶液1. 5mlをエッペンドルフチューブに取った。(保存用としてLBプレートに拡散して37°Cで培養した。) 4°Cで6,000 rpm、2分間遠心した。

20 (2) ppt. + 100  $\mu$  l溶液1(リゾチーム5mg/ml)を加え、室温で5分間放置した後、200  $\mu$  lの溶液2(氷上で穏やかに5分間混合)を添加し、150  $\mu$  lの溶液3(氷上で15分間混合)を添加し、次いで、4°Cで12,000 rpm、5分間遠心した。

25 (3) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等容量のフェノールを添加し、次いで、室温で12,000 rpm、1分間遠心した。

(4) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等

容量の C H C l<sub>3</sub> : i A A ( 9 9 : 1 ) 混合物を加え、室温で 1 2 , 0 0 0 r p m 、 1 分間遠心した。

5 ( 5 ) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、 1  $\mu$  l の M u s s e l グリコーゲンと 9 0 0  $\mu$  l のエタノールを添加し、 - 8 0 °C で 3 0 分間放置した後、 4 °C で 1 5 , 0 0 0 r p m 、 5 分間遠心した。

( 6 ) 沈殿物を乾燥した。 2 0  $\mu$  l の T E 及び 1  $\mu$  l の R N a s s e A ( 5 m g / m l ) を加え、 6 5 °C で 2 0 分間放置した。

( 7 ) このようにして、プラスミド D N A を得た。

10 8 . D N A シーケンス

( 1 ) プラスミド D N A を 1  $\mu$  l とり、 9 9  $\mu$  l の T E にて希釈した。

( 2 ) A 2 6 0 を測定し、 D N A 値を計算した ( A 2 6 0 o f 1 . 0 = 5 0  $\mu$  g / m l ) 。

15 ( 3 ) A 2 6 0 値より、 D N A が 1  $\mu$  g /  $\mu$  l となるように T E にて希釈した。 ( 4 ) D y e ターミネーター法により、 D N A シーケンス ( A B I モデル 3 7 3 A ) を行った。

9 . V 領域の解析

20 このようにして得られた D N A シーケンスをもとに、 V 領域のアミノ酸配列をコンピュータ解析により求めた。結果を図 1 5 ( モノクローナル抗体 N O K 1 ~ 3 の V H 領域のアミノ酸配列 ) 、及び図 1 6 ( モノクローナル抗体 N O K 1 ~ 3 の V L 領域のアミノ酸配列 ) に示す。これらの図において、四角の線で囲った箇所は、超可変領域 ( C D R 1 ~ 3 ) である。

25 [ 実施例 1 0 ] モノクローナル抗体の作製及び特性化

( 1 ) F a s リガンド遺伝子の単離

### ① プライマーの調製

マウス Fas リガンドの遺伝子は、 Nagata et al. の報告をもとに単離した。すなわち、マウス Fas リガンド cDNA の 5' 末端側では、 Xho - I サイトの配列にマウス Fas リガンド 5' 末端の配列 18mer を付加した XhoI - 5' FasL 、マウス Fas リガンド cDNA の 3' 末端側では、 Not1 サイトの配列にマウス Fas リガンド 3' 末端の配列 18mer を付加した Not1 - 3' FasL のそれぞれについて、モデル 392DNA / RNA シンセサイザー (ABI 製) を用いて 0.2 μmol のスケールで DNA 合成を行った。プロトコールに従い生成 DNA を精製して、 PCR 用のプライマーとした。

### ② Fas リガンド cDNA の鑄型の調製

鑄型は、マウス Fas リガンドを発現させた B6 マウス由来の細胞から調製した。具体的には、 B6 マウスの脾細胞を抗 CD3 抗体を固担したプレートを用いて活性化し、この細胞を  $1 \times 10^7$  個回収した。回収した細胞は、 RNAzol B (コスモバイオ製) 1ml に懸濁し、さらに  $100 \mu l$  のクロロホルムを加えてよく混合した後、水上にて 30 分間放置した。その後、 15,000 rpm 、 15 分間の遠心分離 (4 °C) にて、フェノール層と水層とに分け、上層の水層のみを回収した。これに対して等量のイソプロパノールを加え、 -80 °C にて 30 分間放置し、遠心分離 (15,000 rpm 、 15 分間、 4 °C) で RNA を沈殿させた。この沈殿をエタノール 1ml で 1 回遠心洗浄した後、 DEPC 処理した水  $11.5 \mu l$  に懸濁した。この RNA 液  $11.5 \mu l$  に対し、合成のオリゴ dT を  $0.5 \mu l$  ( $0.5 \text{ mg} / \text{ml}$ ) 加え、 70 °C にて 10 分間熱処理を行った。その後、水上にて 5 分間処理した。

その後、5×RT緩衝液（ストラタジーン製）4μlと10mMのdNTP 1μlと0.1MDTT 2μlとSuperscript RTase（ストラタジーン製）1μlとを加え、42℃で50分間反応させ、cDNAへと逆転写させた。90℃で5分間処理し、5RTaseを失活させた後、氷上に5分間放置した。次に、このサンプルにRNase H（ストラタジーン製）1μlを加え、さらに37℃で20分間反応させて不要なRNAを分解した後、これをFasリガンドを含むcDNAの雑型とした。

### ③PCR

10 PCRは、PCR実験マニュアル（HBJ出版、p. 75~85）を参考に、次の条件で実施した。

すなわち、②で作製したcDNA 2μlに対し、10mMのdNTP mix（ファルマシア製）1μl+Xho Iサイト-5'マウスFasL 18mer (50μM) 1μl+Not I-3'マウスFasL 18mer (50μM) 1μl+10×のPCR緩衝液（パーキンエルマー製）4μl+AmpliciTaqTM（パーキンエルマー製）0.5μl+水30.5μlでトータル40μlにし、これにミネラルオイル（シグマ製）40μlを重層した後、PCR用のDNAサーマルサイクラー（パーキンエルマージャパン製）を用いて増幅反応を行った。

20 具体的には、順次、94℃5分間、55℃2分間、72℃3分間、94℃1分間、55℃2分間、及び72℃10分間の条件で、かつ、55℃2分間と94℃1分間との間の処理を30回繰り返すことにより増幅反応を行った。

### ④B CMG Sneoベクターへの組み込み

25 PCRにて増幅反応を行った後、フェノールとクロロホルムの混合液で水層のみを抽出した。この液に、XholとNot I（いず

れもベリンガー社製) 各 1.0 単位加え、付属緩衝液を添加後、37°C にて 16 時間反応した。この液について、1% アガロースゲル電気泳動を行った。UV 照射のもとで、Fas リガンドに相当する約 850 bp のバンドを切り出した。

5 このアガロースゲルから、GENECLEAN II キット (BIO101、フナコシ製) を用いて、DNA を抽出した。すなわち、付属の NaI 液をゲルに加え、65°C で 10 分間インキュベートし、ゲルを解かした後、これにグラスマイルク (glassmilk) を加え 5 分間ローテートし、DNA を吸着させた。このグラスマイルクを New-WASH 液で 3 回洗浄後、TE 緩衝液 10 μl に懸濁し、65°C で 3 分間インキュベートすることにより DNA を溶出させた。

次に、BCMG Sneo ベクターも 1 μg 分、同様に、XhoI と NotI で制限酵素処理を行い、0.75% アガロース電気泳動した後、GENECLEAN II キットを用いて精製した。

15 次に、Fas リガンド cDNA と BCMG Sneo ベクターをライゲーションした。すなわち、ベクター : cDNA = 1 : 2 (モル比) になるように混合し、これに宝酒造製の DNA ライゲーションキットを用いて、16°C にて 16 時間ライゲーション反応を行った。

#### ⑤大腸菌への組み込み

20 前記④の反応液を、大腸菌コンピテントセル (東洋紡製) と混合して、氷上で 30 分間、42°C で 40 秒間インキュベートすることにより、DNA を大腸菌へ導入した。これに対し、SOC 培地を加え、37°C で 1 時間振とう培養後、アンビシリン入りの LB 寒天培地に分注し 37°C にて 1 日間培養した。その後、出現したコロニーを LB 培地で 37°C 1 日間培養した後、アルカリ法にて、プラスミド (マウス Fas リガンド - BCMG Sneo) を回収した。

### (2) L 5 1 7 8 Y 細胞への導入

このマウスFasリガンド-BCMG S n e o 1  $\mu$ gについて、  
L 5 1 7 8 Y細胞  $1 \times 10^6$ 個に対し、エレクトロポレーション法  
5 て、遺伝子導入を行った。条件は、ジーンパルサー（バイオラッド  
製）を用い、296V、960  $\mu$ Fにて実施した。この細胞を、再  
度10% F C S · R P M I 1 6 4 0 培地 5 m l に懸濁した。6 ウェ  
ルプレートにこの細胞の液を入れて培養を行ったが、このとき、G 4 · 1 8  
(G I B C O 製) を 0. 4 m g / m l になるように培地に添加した。  
10 日の培養後コロニーが得られたので、限界希釈法により細胞を  
10 クローニングした。得られたクローンについてノーザンハイブリダ  
イゼーション法によりマウスFasリガンドのmRNAが一番高い  
ものについて選別し、培養した。これをマウスFasリガンド-L 5 1 7 8 Y  
細胞とした。

### (3) 免疫感作

15 前記(2)で調製したFasリガンド発現COS細胞の懸濁液を  
M R L g 1 d マウス(メス、4週齢)の腹腔内に、 $1 \times 10^7$ 個(細  
胞)／匹の割合で注射した。次いで、1週間後から週1回の割合で  
合計3回、同一マウスにFasリガンド発現COS細胞の懸濁液を  
注射することにより、免疫感作した。

### (4) 細胞融合

最終免疫の3日後に、上記マウスから脾臓を取り出した。脾臓を  
細断後、メッシュで濾過し、R P M I 1 6 4 0 培地(日水製)に浮  
遊させ、脾細胞  $1 \times 10^8$ 個を得た。この脾細胞とマウス由来の8-  
アザグアニン耐性株(ヒポキサンチングアニンホスホリボシリルトラ  
25 ンスフェラーゼ欠損株) P 3 X 6 3 A g 8. 6 5 3 (A T C C  
C R L 1 5 8 0) ( $1 \times 10^7$ 個)と約5:1の割合で混合し、遠心

した (1500 r p m, 5 分間)。

得られた細胞のペレットに、50%ポリエチレングリコール4000 (メルク製) / RPMI 1640 溶液2 ml を、37°Cの温水中で攪拌しながら1分間を要して加えた。これにRPMI 1640液15 ml を攪拌しながら6分間を要して加え、細胞融合を行った。融合後、大量(約40 ml)のRPMI 1640液を加え、遠心分離(1500 r p m, 5分)して上清を除去した。次いで、ヒポキサンサンチン(100 μM)、アミノブテリン(0.4 μM)、チミジン(10 μM)を含む10%FCS(牛胎児血清) - RPMI 1640培地(HAT培地)にて、脾細胞が $1 \times 10^6$ 個/mlになるように調製した。

#### (5) ハイブリドーマの選択

上記(4)で調製した細胞浮遊液を96ウェルマイクロプレート10枚に200 μlずつ分注し、37°C、5%CO<sub>2</sub>下にあるCO<sub>2</sub>インキュベータで細胞を培養した。1週間後には、ハイブリドーマのみがコロニーを形成して、増殖していることが確認できた。

#### (6) ハイブリドーマの選別

エフェクター細胞として、マウスFasリガンドを導入したトランスフェクタントmFasL/L5178Yを使用し、かつ、ターゲットとしてFas抗原を細胞表面に発現するトランスフェクタントを用い、マウスFasリガンド発現トランスフェクタントがFas発現トランスフェクタントに対するキラー活性をブロックした培養上清のハイブリドーマを選別した。

##### ① エフェクター細胞の調製

エフェクター細胞は、Fasリガンド遺伝子を導入した細胞(トランスフェクタント)を用いた。すなわちL5178Y細胞にエレクトロポレーション法を用いてマウスFasリガンド - BCMG Sneo

を導入した先述のものを用いた。この細胞を、10%FCS・RPMI1640培地で $1 \times 10^6$ 個／mlに合わせたものを50ml用意した。

## ②ターゲット細胞の調製

ターゲット細胞には、ヒトFas遺伝子を導入したWR19L細胞を用いた。WR19L(ATCC TIB52)へのヒトFas遺伝子の導入は、常法に従って行った。具体的には、Hanabuchiらの文献(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, No. 11, p. 4930-4934, 1994)を参考にして作製した。得られたFas-WR19L細胞を培養し、10%FCS・RPMI培地にて $1 \times 10^7$ 個を回収した。これについて1mCiの<sup>3</sup>H-チミジンを含む10%FCS・RPMI1640培地10mlで37℃で1晩培養し、細胞内に<sup>3</sup>H-チミジンを取り込ませた。

次いで、細胞を遠心分離にて回収後、10%FCS・RPMI培地で遠心洗浄を3回繰り返した後、10%FCS・RPMI培地で $2 \times 10^5$ 個／mlとし、これをターゲット細胞とした。

## ③スクリーニングアッセイ

まず①で調製したエフェクター細胞を96ウェルU型プレート(コーニング製)10枚について、各ウェル $50 \mu l$ ずつ分注した。次いで、各ハイブリドーマの培養上清を $100 \mu l$ 加え、37℃で1時間インキュベートした。この後、②で調製したFas/WR19Lターゲット細胞を $50 \mu l$ ／ウェル加え、37℃ 5%CO<sub>2</sub>の環境下のもと、6時間インキュベートした。

その後、プレートを遠心分離し、上清液について液体シンチレーションカウンターを用い<sup>3</sup>Hのカウントを測定した。なお、100%生存のコントロールとしてエフェクター細胞 $50 \mu l$ のかわりに培養液を $50 \mu l$ 加えたものを用いた。また、100%死滅のコント

ロールとして、培養上清  $100\mu\text{l}$  のかわりに 2% トリトン  $\times 100$  溶液を  $100\mu\text{l}$  入れたものを用いた。この 100% 生存、 100% 死滅の  $^3\text{H}$  カウントをもとに各ウェルでの細胞生存率を算定し、生存率の高いウェルを選択した。

5 (7) クローニング

抗体産生細胞（ハイブリドーマ）を、限界希釈法により 1 個／ウェルとなるように、 96 ウェルマイクロプレートに分注し、培養した。 10 日間の培養後、シングルコロニーの増殖が確認できたため、再び、キラー活性のブロックによる抗体検出の操作を行った。その 10 結果、 Fas リガンドと特異的に反応するクローニングを得た。次いで、单一クローニングのハイブリドーマの培養上清液から抗体を回収することにより、目的とする Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を得た。

こうして得られたモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマは、 KAY-10 と名づけられ、受託番号 FERM BP-5334 として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

(8) 抗マウス Fas リガンド抗体の調製

樹立した抗マウス Fas リガンドに対する抗体産生ハイブリドーマ KAY-10 を、  $1 \times 10^7$  個／匹の割合でプリスタン 0.5 ml／匹を 1 週間前に腹腔に前投与した ICR ヌードマウス（日本リャルズリバー） 3 匹に腹腔接種した。約 2 週間の飼育後、腹水を回収した。回収した腹水を Protein G セファロースで IgG に精製した。

この精製した抗体を KAY-10 と呼び、これを用いて以下の実験を行った。

(9) フローサイトメーターを用いた Fas リガンドの解折

マウス Fas L を発現した細胞は、L 5 1 7 8 Y 細胞と BHK 細胞を用いた。BHK 細胞にマウス Fas リガンドを導入する方法は L 5 1 7 8 Y 細胞と同じエレクトロポレーション法で実施した。

以下の細胞を用いて、KAY-10 抗体の反応性を調べた。

5 ① BHK 細胞、② マウス Fas リガンド／BHK 細胞、③ L 5 1 7 8 Y 細胞、④ マウス Fas リガンド／L 5 1 7 8 Y 細胞、⑤ ヒト Fas リガンド／L 5 1 7 8 Y 細胞

これらの細胞を前日に BB-94 を  $10 \mu M$  含む 10% FCS RPMI 培地で培養しておき、これらの細胞を回収した。その後、これらの 10 細胞は、それぞれ PBS で  $1 \times 10^6$  個／ml に調製した。チューブ (ファルコン No. 2008) に、この細胞を  $1 \times 10^6$  個ずつ入れた (各細胞ごとに 2 本作成)。次いで、1 本には KAY-10 抗体  $1 \mu g$  を入れ、もう 1 本には PBS  $1 \mu l$  をネガティブコントロールとして入れ、氷上で 30 分間反応させた。次いで、PBS で遠心洗 15 净 (1500 rpm、1 分間、2 回) し、PE-抗マウス Ig's (大日本製薬／カルタグ製)  $1 \mu l$  を加え、さらに氷上で 20 分間反応させた。反応後、PBS で 2 回遠心洗浄を行い、PBS  $200 \mu l$  に懸濁した後、FACScan にて測定した。

その結果、KAY-10 抗体は、マウス Fas リガンドを発現させた BHK 及び L 5 1 7 8 Y 細胞にのみ反応し、親株の BHK 及び L 5 1 7 8 Y 細胞やヒト Fas リガンドを発現させた L 5 1 7 8 Y 細胞には反応しないことがわかった。これらの結果を、図 17～21 に示す。

#### (10) マウス脾臓由来の活性化 T 細胞での解折

25 得られた KAY-10 抗体がどのようなマウス由来の細胞の Fas リガンドと反応するか調べた。

B 6 マウス、B a l b / c マウス、C 3 H マウス、D B A マウスから脾臓を摘出し、細断後、メッシュを通して、細胞浮遊液を作製した。この細胞浮遊液をナイロンウールカラムでT細胞が豊富になるよう調製した。さらに、この細胞をc o n A (1 0  $\mu$  g / m l) を含む1 0 % F C S · R P M I 培地で3 7 °Cで2日間培養した。2日後遠心分離により細胞を回収し、5 0 U / m l のI L - 2 を含む1 0 % F C S · R P M I 培地でさらに5日間培養した。さらに、この細胞を回収した後、抗C D 3 抗体1 0  $\mu$  g / m l でP r e - c o a t した培養シャーレでさらに4時間培養した。このとき、培養液は、  
5 B B 9 4 が1 0  $\mu$  M入った1 0 % F C S · R P M I 培地を用いた。  
この細胞を回収後、(9)と同じ方法でF A C S 解折を行った。その結果、図2 2 ~ 2 5 に示すように、K A Y - 1 0 抗体は、B 6 マウス、C 3 H マウス由来の細胞のF a s リガンドとは良好な反応を示すが、D B A マウス、B a l b / c マウス由来の細胞とは反応が弱いか、ほとんど反応しない結果が得られ、種特異性があることがわかった。  
10 15

D B A マウス、B a l b / c マウスのM H C クラスIIは、H - 2<sup>d</sup>であり、K A Y - 1 0 抗体を得るためにF a s リガンド発現C O S 細胞を免疫感作したM R L g l d マウスのM H C クラスIIもH - 2<sup>d</sup>である。一方、B 6 マウス、C 3 H マウスのM H C クラスIIは、それぞれH - 2<sup>b</sup>、H - 2<sup>k</sup>であり、これらは、M R L g l d マウスのM H C クラスIIタイプとは異なる。これより、抗体を得るためにF a s リガンドを免疫感作したマウスのM H C クラスIIのタイプと同じタイプに分類されるマウスに由来するF a s リガンドとは、本発明のマウスF a s リガント抗体は反応しないことが示された。  
20 25

(1 1) マウスF a s リガンドが持つF a s 発現細胞に対するアポ

### トーシス能の抑制

精製した抗体 K A Y - 1 0 を用いて (6) ハイブリドーマの選別で実施した細胞障害反応を行った。すなわち、エフェクター細胞をマウス F a s リガンド / L 5 1 7 8 Y 細胞、ターゲット細胞をヒト F a s / W R 1 9 L 、抗体として K A Y - 1 0 を最終濃度 1 0  $\mu$  g / m l となるようにして、反応を調べた。その結果を図 2 6 に示す。図 2 6 の縦軸は、実施例 1 0 の (6) の③で定義した 1 0 0 % 死滅及び 1 0 0 % 生存 (0 % 死滅) に比し、どれだけ細胞が死滅したかを % で示す。この図 2 6 からわかるように、抗体の添加により、 F a s リガンドによる h F a s / W R 1 9 L へのアポトーシス誘導を完全に抑制することがわかった。

### (12) 種々の T h 1 タイプ T 細胞株での抗体によるアポトーシス抑制の検討

エフェクター細胞として種々の T h 1 タイプの細胞株を用いた。すなわち、 1 2 9 細胞、 B K 1 細胞、 P O K 細胞、 T 1 6 D 細胞を用いた。これらの細胞を予め 1 0 m M の P M A と 5 0 0 n M のイオノマイシンで 6 時間インキュベートさせ活性化したものをエフェクター細胞に用いた。その後、アッセイしたところ、その結果、図 2 7 (縦軸は、図 2 6 と同じ) に示すように、 K A Y - 1 0 の濃度依存的にこれらの T h 1 クローンが持つアポトーシス誘導活性を抑制することがわかった。唯一 B K 1 細胞に対しては効果がなかったが、 B K 1 細胞が、 B a 1 b / c 由来の T h 1 細胞株であることから先述の F A C S 解析の結果と一致している。すなわち、 K A Y - 1 0 抗体は、 B a 1 b / c の F a s リガンドとは反応しない。

#### 25 [実施例 1 1 ]

1. F a s リガンドの細胞外ドメインの N 末端からの 1 0 m e r

のペプチド、5番目から14番目までの10merのペプチド、9番目から18番目の10mer、13番目から22番目までの10merと、4merずつずらしながら10merのペプチドを44種類合成したペプチドライブラーを作成した（ペプセット（登録商標、5 カイロン社製）を利用した）。

2. NOK2ハイブリドーマの培養上清を用いてFasリガンド抗体が反応するFasリガンドの部位を特定した。

① 96ウェルプレート（マキシソープ、登録商標、ヌンク社製）の各ウェルをプロッキング液〔ロックエース（大日本製薬社製）10 を蒸留水で4倍に希釈したもの〕で満たし、さらに、このプレートの各ウェルにペプセットのピン（先端に合成されたペプチドが固定されている）を入れ、ピンの先端を室温で2時間プロッキングした。

② プロッキング終了後、ペプセットのピンを取り出し、PBSで洗浄した。

15 ③ 新しい96ウェルプレートにNOK2ハイブリドーマの培養上清を100μl／ウェル分注した。コントロールには、ペプセット付属の抗体液を使用した（ペプセットには陽性のコントロールのピンと陰性のコントロールのピン及びそれらに対する抗体液が用意されている）。

20 ④ その後、ペプセットのピンを③のプレートの各ウェルに入れ、室温で2時間反応させた。

⑤ ④のプレートからペプセットのピンを取り出し、PBSが入ったパッドに移し、振盪洗浄を10分間3回行った。

25 ⑥ 新しい96ウェルプレートにPBSで1000倍に希釈したHRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）標識抗マウスIgG（カペル社製）を100μl／ウェル分注し、さらに、ペプセットのピンをこのプ

レートの各ウェルに入れ、室温で2時間反応させた。

⑦ 反応後、ペプセットのピンを取り出し、PBSで10分間3回振盪洗浄した。

⑧ 新しい96ウェルプレートに下記組成の基質液を100μl/5ウェル分注し、さらにペプセットのピンを該プレートの各ウェルに入れ、室温で20分間反応させた。

基質液の組成：

OPD 0.4mg/ml、30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.4μl/ml、0.1Mクエン酸リン酸緩衝液(pH5.1)

⑨ プレートからペプセットのピンを取り出した後、2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を各ウェルに50μl添加して反応を止めた。

⑩ このプレートの各ウェルの液の吸光度をプレートリーダー(バイオラッド社製)で測定した。

⑪ この結果、NOK2のハイブリドーマの培養上清については、LSHKVYMRNS、VYMRNSKYQPのペプチドを固定したピンを入れたウェルで、ピンに固定したペプチドに結合したHRPによる酵素反応による色の変化がみられた。すなわち、NOK2のハイブリドーマが産生する抗Fasリガンド抗体は、FasリガンドのLSHKVYMRNSKYQPの部分を認識するものであることが判明した。

産業上の利用可能性

本発明のFasリガンドに対するモノクローナル抗体は、Fasリガンドに特異的に反応することから、例えば、Fas抗原とそのリガンドとの相互作用の解析を行うことにより、細胞にアポトーシスを誘導するシグナル伝達機構やFasのシステムを解明すること

ができる。

本発明の Fas リガンドに対するモノクローナル抗体は、免疫治療や診断、及びこれらに関連した産業分野において有用である。すなわち、Fas リガンドに対する抗体を血液中の細胞と反応させ、5 蛍光標識の 2 次抗体をさらに結合させ、フローサイトメトリーあるいは蛍光顕微鏡で測定すれば、Fas リガンドがどの細胞に発現されているかを見極めることができる。Fas リガンドに対するモノクローナル抗体を FITC、PE のような蛍光色素に結合させることは容易であり、したがって、2 次抗体を使用せずに解析することができる。また、複数のモノクローナル抗体を組み合わせることにより Fas リガンドの濃度の検出も可能であり、これらにより診断 10 や基礎研究の分野で非常に有用である。

種々の疾患（例えば、自己免疫疾患、リューマチ、肝炎など）の患者から取り出した組織等に対し、本発明のモノクローナル抗体で反応させて、Fas リガンドを発現している細胞が組織のどこに存在しているかを調べることができる。これにより、各種疾患の診断 15 や治療へつなげることが可能となる。Fas リガンドに対するモノクローナル抗体は、Fas リガンドの反応（結合）を阻害することから、エイズ、肝炎、リューマチ等の疾患の治療に有用なものとなる。また、本発明のモノクローナル抗体から、抗体産生遺伝子を合成し、Fas リガンドとの結合にかかわる部分のみをヒトの IgG 20 型の抗体に移植すれば、ヒト型抗体を得ることができ、上述の多くの疾患の治療に有用となる。

本発明のモノクローナル抗体は、サルの Fas リガンドにも反応 25 することからエイズ治療、ウイルス性肝炎等をはじめとする治療用抗体の検討に有用であるとともに、新しい治療薬のスクリーニング

において効果をモニターできるので非常に有用である。とくにウイルス感染症等は、マウスでは実験系がくめないケースが多いため、ヒトとサルに反応することは大きなメリットである。

また、本発明のヒト Fas リガンドに対するモノクローナル抗体  
5 は、マウスの Fas リガンドと反応しないことは、SCID マウス等での検討でも役立つ。ヒトの細胞をマウスに移植した後の作用等を特異的に阻害させたり、モニターするのにも有用となる。

### 国際寄託機関

10 ハイブリドーマ NOK 1 ~ 5 及び KAY - 1 0 は、以下の国際寄託機関に、それぞれ下記の受託番号と寄託日で寄託されている。

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住所：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（郵便番号 305）

#### 受託番号及び寄託日

15 ①ハイブリドーマ NOK 1

F E R M B P - 5 0 4 4 : 1 9 9 5 年 3 月 2 0 日

②ハイブリドーマ NOK 2

F E R M B P - 5 0 4 5 : 1 9 9 5 年 3 月 2 0 日

③ハイブリドーマ NOK 3

F E R M B P - 5 0 4 6 : 1 9 9 5 年 3 月 2 0 日

④ハイブリドーマ NOK 4

F E R M B P - 5 0 4 7 : 1 9 9 5 年 3 月 2 0 日

⑤ハイブリドーマ NOK 5

F E R M B P - 5 0 4 8 : 1 9 9 5 年 3 月 2 0 日

20 ⑥ハイブリドーマ KAY - 1 0

F E R M B P - 5 3 3 4 : 1 9 9 5 年 1 2 月 1 4 日

## 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：120

5 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

10 1 5 10 15

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp

20 25 30

Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

15 Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Asp Asn Gly Lys Phe Lys

50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

65 70 75 80

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala

20 85 90 95

Arg Ser Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Pro Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

25

配列番号：2

配列の長さ：360

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

5 配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

	GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA	48
	GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TCC TGG	96
10	ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA AAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA	144
	CGA ATT TAT CCT GGA GAT GGA GAT ACT AAC GAC AAC GGG AAG TTC AAG	192
	GGC AAG GCC ACA CTG ACC GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
	CAA CTC AGC AGT CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAC TTC TGT GCA	288
	AGA TCG TAT TAC TAC GAT GGT AGC CCC TGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA	336
15	GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	360

配列番号：3

配列の長さ：108

配列の型：アミノ酸

20 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
	1	5	10	15
25	Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
	20	25	30	
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45	

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 5 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Phe Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

10 配列番号 : 4

配列の長さ : 324

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴 :

特徴を決定した方法 : E

20 配列

GAC ATC CAG ATG ACG CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCC TCT CTG GGA	48
GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC AGG GCA AGT CAG GAT ATT AGC AAT TAT	96
TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT AAA CTC CTG ATC	144
TAC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC	192
25 AGT GGG TCT GGG ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATC AGC AAC CTG GAA CCT	240
GAA GAT ATT GCC ACT TAC TTT TGT CAG CAA TAT AGT GAA TTT CCG TGG	288
ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG	324

配列番号 : 5

配列の長さ : 118

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

5 配列の種類 : ペプチド

配列

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser

1

5

10

15

Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp

10

20

25

30

Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35

40

45

Tyr Leu Tyr Pro Gly Gly Leu Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

50

55

60

15 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

65

70

75

80

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85

90

95

Arg Tyr Arg Asp Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

20

100

105

110

Thr Val Thr Val Ser Ser .

115

配列番号 : 6

25 配列の長さ : 354

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

## 起源

マウス

## 配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

## 5 配列

GTG CAG CTG CAG CAG TCA GGA GCT GAG CTG GTA AGG CCT GGG ACT TCA	48
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT GCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAC TGG	96
ATA GGT TGG GTA AAG CAG AGG CCT GGA CAT GGC CTT GAG TGG ATT GGA	144
TAT CTT TAC CCT GGA GGT CTT TAT ACT AAC TAC AAT GAG AAG TTC AAG	192
10 GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC ACA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCC ATC TAT TAC TGT GCA	288
AGA TAC AGG GAT TAC GAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC	336
ACG GTC ACC GTC TCC TCA	354

## 15 配列番号：7

配列の長さ：113

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 20 配列

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

25 Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Gly Trp Cys Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65

70

75

80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser

85

90

95

5 Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

110

Arg

10 配列番号 : 8

配列の長さ : 339

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴 :

特徴を決定した方法 : E

20 配列

GAT GTT TTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCT CTG CCT GTC AAT ATT GGA 48

GAT CAA GCC TCT ATC TCT TGC AAG TCT ACT AAG AGC CTT CTG AAT AGT 96

GAT GGA TTC ACT TAT TTG GGC TGG TGC CTG CAG AAG CCA GCC CAG TCT 144

CCA CAG CTC CTA ATA TAT TTG GTT TCT AAT CGA TTT TCT GGA GTT CCA 192

25 GAC AGG TTC ACT GGT AGT GGG TCA GGG ACA GAT TTC ACC CTC AAG ATC 240

AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAT TGC TTC CAG AGT 288

AAC TAT CTT CCT CTT ACG TTC GGA TCG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA 336

CGG 339

配列番号 : 9

配列の長さ : 116

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

5 配列の種類 : ペプチド

配列

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

1 5 10 15

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp

10 20 25 30

Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Arg Ile Tyr Pro Val Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

50 55 60

15 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met

65 70 75 80

Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala

85 90 95

Thr Asp Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

20 100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

配列番号 : 10

25 配列の長さ : 348

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

## 起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

## 5 配列

GTG AAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA	48
GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TCC TGG	96
ATG AAC TGG GTG AAA CAG AGG CCT GGG AAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA	144
CGG ATT TAT CCT GTA AAT GGA GAT ACT AAC TAC AAT GGG AAG TTC AAG	192
10 GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAC TTC TGT GCA	288
ACC GAT GGT TAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC	336
ACC GTC TCC TCA	348

## 15 配列番号：11

配列の長さ：118

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

## 20 配列

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser			
1	5	10	15
Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr			
20	25	30	
25 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met			
35	40	45	
Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys			
50	55	60	

Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 5 Val Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115

10 配列番号 : 12

配列の長さ : 354

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴 :

特徴を決定した方法 : E

20 配列

GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GGC CTC GTG AAA CCT TCT CAG TCT	48
CTG TCT CTC ACC TGC TCT GTC ACT GGC TAC TCC ATC ACC AGT GGT TAT	96
TAC TGG AAC TGG ATC CGG CAG TTT CCA GGA AAC AAA CTG GAA TGG ATG	144
GGC TAC ATA AGC TAC GAT GGT AGC AAT AAC TAC AAC CCA TCT CTC AAA	192
25 AAT CGA ATC TCC ATC ACT CGT GAC ACA TCT AAG AAC CAG TTT TTC CTG	240
AAG TTG AAT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCC	288
GTT TAT TAC TAC GAT GGT AGC TCT TTT GAC TAC TGG GCC CAA GGG ACC	336
ACG GTC ACC GTC TCC TCA	354

配列番号 : 13

配列の長さ : 112

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

5 配列の種類 : ペプチド

配列

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Arg

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Gly Val Asp Ser Tyr

10 20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Tyr Leu Lys Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

15 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

20 100 105 110

配列番号 : 14

配列の長さ : 336

配列の型 : 核酸

25 鎮の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

	GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA AGG	48
5	CAG AGG GCC ACC ATA TCC TGC AGA GCC AGT GAA GGT GTT GAT AGT TAT	96
	GGC ATT AGT TTT ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC	144
	AAA CTC CTC ATC TAT CGT GCA TCC TAC CTA AAA TCT GGG GTC CCT GCC	192
	AGG TTC AGT GGT AGT GGG TCT AGG ACA GAC TTC ACC CTC ACC ATT GAT	240
	CCT GTG GAG GCT GAT GCT GCA ACC TAT TAC TGT CAG CAA AAT AAT	288
10	GAG GAT CCG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG	336

配列番号：15

配列の長さ：117

配列の型：アミノ酸

15 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

	Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Pro Ala Lys Pro Gly Ala Ser			
	1	5	10	15
20	Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp			
	20	25	30	
	Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly			
	35	40	45	
	Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys			
25	50	55	60	
	Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met			
	65	70	75	80
	Gln Leu Ile Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
	85	90	95	

Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

5

配列番号：16

配列の長さ：351

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

10 トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

15 特徴を決定した方法：E

配列

GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGG GCT GAA CCG GCA AAA CCT GGG GCC TCA	48
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT ACC TAC TGG	96
ATG CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA	144
20 TAC ATT AAT CCT AGC AGT GGT TAT ACT GAG TAC AAT CAG AAG TTC AAG	192
GAC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
CAA CTA ATC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA	288
AGA AGG GGT AAT TAC TAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG	336
GTC ACC GTC TCC TCA	351

25

配列番号：17

配列の長さ：105

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状



GAC AGG GTT ACC ATG ACC TGC AAG GCC AGT CAG AGT GTG GGT AAT AAT	96
GTG GCC TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATA	144
TAC TAT ACA TCC AAT CGC TAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACT GGC	192
AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT TTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GTT	240
5 GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT CAG CAG CAT TAT AGC TCT CCG TAT	288
ACG TTC GGA TCG GGG ACC AAG CTG GAG	315

配列番号：19

配列の長さ：121

10 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala	
15 1 5 10 15	
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser	
20 20 25 30	
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
35 35 40 45	
20 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Asp Asn Gly Lys Phe	
50 50 55 60	
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	
65 65 70 75 80	
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
25 85 90 95	
Ala Arg Ser Tyr Tyr Asp Gly Ser Pro Trp Phe Thr Tyr Trp Gly	
100 100 105 110	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
115 115 120	

配列番号 : 20

配列の長さ : 363

配列の型 : 核酸

5 鎮の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

マウス

10 配列の特徴 :

特徴を決定した方法 : E

配列

CAG	GTT	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGA	CCT	GAG	CTG	GTG	AAG	CCT	GGG	GCC	48	
TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAT	GCA	TTC	AGT	AGC	TCC	96	
15	TGG	ATG	AAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	AAG	GGT	CTT	GAG	TGG	ATT	144
CGA	ATT	TAT	CCT	GGA	GAT	GGA	GAT	ACT	AAC	GAC	AAC	GGG	AAG	TTC	AAG	192	
GGA	GGC	AAG	GCC	ACA	CTG	ACC	GCA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	240	
ATG	CAA	CTC	AGC	AGT	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAC	TTC	TGT	288	
GCA	AGA	TCG	TAT	TAC	TAC	GAT	GGT	AGC	CCC	TGG	TTT	ACT	TAC	TGG	GGC	336	
20	CAA	GGG	ACT	CTG	GTC	ACT	GTC	TCT	GCA							363	

配列番号 : 21

配列の長さ : 108

配列の型 : アミノ酸

25 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Aia Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 5 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Phe Pro Trp  
 10 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

配列番号 : 22

15 配列の長さ : 324

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

20 起源

マウス

配列の特徴 :

特徴を決定した方法 : E

配列

25	GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT GCC TCT CTG GGA	48
	GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC AGG GCA AGT CAG GAT ATT AGC AAT TAT	96
	TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT AAA CTC CTG ATC	144
	TAC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC	192
	AGT GGG TCT GGG ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATC AGC AAC CTG GAA CCT	240

GAA GAT ATT GCC ACT TAC TTT TGT CAG CAA TAT AGT GAA TTT CCG TGG	288
ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG	324

配列番号 : 23

5 配列の長さ : 119

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

10 Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1	5	10	15
---	---	----	----

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20	25	30
----	----	----

Trp Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

15	35	40	45
----	----	----	----

Gly Tyr Leu Tyr Pro Gly Gly Leu Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50	55	60
----	----	----

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
----	----	----	----

20 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Tyr Arg Asp Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100	105	110
-----	-----	-----

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

25	115
----	-----

配列番号 : 24

配列の長さ : 357

配列の型 : 核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

5 マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

	CAG GTC CAC CTG CAG CAG TCT GGA GCT GAG CTG GTA AGG CCT GGG ACT	48
10	TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT GCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAC	96
	TGG ATA GGT TGG GTA AAG CAG AGG CCT GGA CAT GGC CTT GAG TGG ATT	144
	GGA TAT CTT TAC CCT GGA GGT CTT TAT ACT AAC TAC AAT GAG AAG TTC	192
	AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC ACA TCC TCC AGC ACA GCC TAC	240
	ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCC ATC TAT TAC TGT	288
15	GCA AGA TAC AGG GAT TAC GAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGT CAA GGA	336
	ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA	357

配列番号：25

配列の長さ：113

20 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

	Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile Gly	
25	1 5 10 15	
	Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser	
	20 25 30	
	Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Gly Trp Cys Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	
	35 40 45	

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 5 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser  
 85 90 95  
 Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 10 Arg

10

配列番号 : 26

配列の長さ : 339

配列の型 : 核酸

15 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

マウス

20 配列の特徴 :

特徴を決定した方法 : E

配列

GAT	GTT	GTT	CTG	ACC	CAA	ACT	CCA	CTC	TCT	CTG	CCT	GTC	AAT	ATT	GGA	48	
GAT	CAA	GCC	TCT	ATC	TCT	TGC	AAG	TCT	ACT	AAG	AGC	CTT	CTG	AAT	AGT	96	
25	GAT	GGA	TTC	ACT	TAT	TTG	GGC	TGG	TGC	CTG	CAG	AAG	CCA	GGC	CAG	TCT	144
	CCA	CAG	CTC	CTA	ATA	TAT	TTG	GTT	TCT	AAT	CGA	TTT	TCT	GGA	GTT	CCA	192
	GAC	AGG	TTC	AGT	GGT	AGT	GGG	TCA	GGG	ACA	GAT	TTC	ACC	CTC	AAG	ATC	240
	AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	TTG	GGA	GTT	TAT	TAT	TGC	TTC	CAG	AGT	288
	AAC	TAT	CTT	CCT	CTT	ACG	TTC	GGA	TCG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATA	AAA	336

CGG

339

配列番号 : 27

配列の長さ : 117

5 配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

10 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

15 Gly Arg Ile Tyr Pro Val Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

20 85 90 95

Ala Thr Asp Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr

100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

25

配列番号 : 28

配列の長さ : 351

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

### トポロジー：直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

## 起源

## マウス

## 5 配列の特徴：

### 特徴を決定した方法: E

## 配列

	CAG GTT CAG CTG CAG CAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC	48
	TCA GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TCC	96
10	TGG ATG AAC TGG GTG AAA CAG AGG CCT GGG AAG GGT CTT GAG TGG ATT	144
	GGA CGG ATT TAT CCT GTA AAT GGA GAT ACT AAC TAC AAT GGG AAG TTC	192
	AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC	240
	ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAC TTC TGT	288
	GCA ACC GAT GGT TAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG	336
15	GTC ACC GTC TCC TCA	351

配列番号：29

配列の長さ : 108

### 配列の型：アミノ酸

20 トポロジー：直鎖状

### 配列の種類：ペプチド

## 配列

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly

1

5

10

15

25 Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Iys Ala Ser Cys Asp Val Asp Ile - 8

30

25

2

85

27

— 5 —

Tyr Gly Thr Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ala

65

70

75

80

5 Glu Asp Leu Ser Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Ser Tyr Ser Tyr Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

10 配列番号 : 30

配列の長さ : 324

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

15 配列の種類 : cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴 :

特徴を決定した方法 : E

20 配列

AAC ATT GTA ATG ACC CAA TCT CCC AAA TCC ATG TCC ATG TCA GTA GGA 48

GAG AGG GTC ACC TTG AGC TGC AAG GCC AGT GAG AAT GTG GAT ATT TAT 96

GTA TCC TGG TAT CAA CAG AAA CCA GAG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATA 144

TAC GGG ACA TCC AAC CGG TAC ACT GGG GTC CCC GAT CGC TTC ACA GGC 192

25 AGT GGA TCT GCA ACA GAT TTC ACT CTG ACC ATC AGC AAT GTG CAG GCT 240

GAA GAC CTT TCA GAT TAT TAC TGT GTA CAG AGT TAC AGC TAT CCG TGG 288

ACA TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG 324

配列番号：31

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

5 配列の種類：ペプチド

配列

Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln

1

5

10

10

15

20

25

## 請求の範囲

1. Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

5 2. Fasリガンドの種がヒトである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

3. Fasリガンドの種がマウスである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

4. 当該抗体を得るためにFasリガンドを免疫感作したマウス  
10 のMHCクラスIIのタイプと同じタイプに分類されるマウス由来の  
Fasリガンドには反応しないことを特徴とする請求項3記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

5. マウス起源のモノクローナル抗体である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

15 6. 工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5044  
(ハイブリドーマNOK1)、FERM BP-5045(ハイブリドーマNOK2)、FERM BP-5046(ハイブリドーマNOK3)、FERM BP-5047(ハイブリドーマNOK4)、  
FERM BP-5048(ハイブリドーマNOK5)、及びFERM  
20 BP-5334(ハイブリドーマKAY-10)として寄託されているハイブリドーマ細胞株のいずれか1つから產生されるモノクローナル抗体である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

7. ヒトの細胞上のFasリガンドあるいは可溶性Fasリガンドを認識し、かつ、サルの細胞表面上のFasリガンドをも認識することができる請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性

フラグメント。

8. Fasリガンドにおける配列表の配列番号31で表されるアミノ酸配列部分と反応する請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

5 9. FasリガンドとFasとの生理的な反応よりも強くFasリガンドと結合することができる請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

10 10. FasリガンドとFasとの生理的反応を抑制することができる請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

11. FasリガンドとFasとの生理反応の抑制が、Fasリガンド発現細胞が分泌する可溶性FasリガンドあるいはFasリガンド発現細胞の表面に存在するFasリガンドにより引き起こされるFas発現細胞のアポトーシスの抑制である請求項10記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

12. 可溶性FasリガンドがFas発現細胞に対して引き起こすアポトーシスを90%以上のアポトーシス抑制率（ただし、アポトーシス抑制率とは、Fasリガンドを遺伝子導入した細胞の培養上清の12倍希釈液中に含まれる可溶性Fasリガンドをエフェクター分子とし、一方、Fasを遺伝子導入した細胞をターゲット細胞とし、両者を96ウエルプレート中で100μlの反応系で反応させ、ターゲット細胞の16時間後の生存率を生細胞数検出試薬を用いて測定する細胞障害反応試験において、抗体を添加したときのターゲット細胞の生存率である。）で抑制する請求項11記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

13. モノクローナル抗体が前記ハイブリドーマNOK1ないし

NOK5のいずれか1つのハイブリドーマが產生するモノクローナル抗体であって、Fasリガンドを遺伝子導入した細胞の培養上清の12倍希釈液中に中に含まれる可溶性Fasリガンドをエフェクター分子とし、その希釈液25μlを用い、一方、Fasを遺伝子導入した細胞(Fas/WR19L)をターゲット細胞とし、該細胞の濃度2×10<sup>5</sup>/ml液50μlを用い、そして、前記モノクローナル抗体を含むハイブリドーマの培養上清25μlを用い、これらのすべてを混合した後、37℃で16時間反応させたとき、ターゲット細胞の生存率(すなわち、アポトーシス抑制率)を90%以上とすることができる請求項12記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

14. アポトーシスの抑制活性がFas-Igキメラ分子よりも高い請求項11記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

15. 0.01~8μg/mlの濃度(実効濃度)において、Fas-Igキメラ分子に比べて高いアポトーシスの抑制活性を示す請求項14記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

16. FasリガンドとFasとの生理的反応を抑制する点において、ヒトのFasリガンドの生理的反応は抑制することができるが、マウスのFasリガンドの生理的反応は抑制できない請求項10記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

17. Fasリガンド発現細胞の培養上清中に存在する可溶性Fasリガンドをアフィニティー精製することができる請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

25. Fasリガンド発現細胞上のFasリガンド分子あるいは培養液中に分泌された可溶性Fasリガンド分子を免疫沈降するこ

とができる請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

19. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044 として寄託されているハイブリドーマ NOK1 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の超可変領域が配列表の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の① 30 番目の Ser から 34 番目の Asn、② 49 番目の Arg から 65 番目の Gly、及び③ 93 番目の Tyr または 98 番目の Ser から 109 番目の Tyr である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

20. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044 として寄託されているハイブリドーマ NOK1 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の超可変領域が配列表の配列番号 3 で表されるアミノ酸配列の① 24 番目の Arg から 34 番目の Asn、② 50 番目の Tyr から 56 番目の Ser、及び③ 89 番目の Glu から 97 番目の Thr である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

21. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5045 として寄託されているハイブリドーマ NOK2 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の超可変領域が配列表の配列番号 5 で表されるアミノ酸配列の① 30 番目の Asn から 34 番目の Gly、② 49 番目の Tyr から 65 番目の Gly、及び③ 93 番目の Tyr または 98 番目の Tyr から 107 番目の

T y r である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

22. ヒト F a s リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 5 として寄託されているハイブリドーマ N O K 2 が產生する抗体と同等であり、(2) L 鎮の超可変領域が配列表の配列番号 7 で表されるアミノ酸配列の① 2 4 番目の L y s から 3 9 番目の G l y 、② 5 5 番目の L e u から 6 1 番目の S e r 、及び③ 9 4 番目の P h e または 9 5 番目の G l n から 1 0 2 番目の T h r である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

23. ヒト F a s リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 6 として寄託されているハイブリドーマ N O K 3 が產生する抗体と同等であり、(2) H 鎮の超可変領域が配列表の配列番号 9 で表されるアミノ酸配列の① 3 0 番目の S e r から 3 4 番目の A s n 、② 4 9 番目の A r g から 6 5 番目の G l y 、及び③ 9 3 番目の T y r または 9 8 番目の A s p から 1 0 5 番目の V a l である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

24. ヒト F a s リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 6 として寄託されているハイブリドーマ N O K 3 が產生する抗体と同等であり、(2) L 鎮の超可変領域が配列表の配列番号 2 9 で表されるアミノ酸配列の① 2 4 番目の L y s から 3 4 番目の S e r 、② 5 0 番目の G l y から 5 6 番目の T h r 、

及び③89番目のV<sub>al</sub>または90番目のG<sub>ln</sub>から97番目のT<sub>hr</sub>である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

25. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのア  
5 ポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番  
号F E R M B P - 5 0 4 7として寄託されているハイブリドーマ  
N O K 4が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の超可変領域が  
配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列の①32番目のT<sub>yr</sub>  
から35番目のA<sub>sn</sub>、②50番目のT<sub>yr</sub>から65番目のA<sub>sn</sub>、  
10 及び③93番目のT<sub>yr</sub>から107番目のT<sub>yr</sub>である請求項1記  
載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

26. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのア  
ポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番  
号F E R M B P - 5 0 4 7として寄託されているハイブリドーマ  
15 N O K 4が產生する抗体と同等であり、(2)L鎖の超可変領域が  
配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列の①24番目のA<sub>rg</sub>  
から38番目のH<sub>is</sub>、②54番目のA<sub>rg</sub>から60番目のS<sub>er</sub>、  
及び③93番目のG<sub>ln</sub>から101番目のT<sub>hr</sub>である請求項1記  
載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

27. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのア  
ポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番  
号F E R M B P - 5 0 4 8として寄託されているハイブリドーマ  
N O K 5が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の超可変領域が  
配列表の配列番号15で表されるアミノ酸配列の①30番目のT<sub>hr</sub>  
25 から34番目のH<sub>is</sub>、②49番目のT<sub>yr</sub>から65番目のA<sub>sp</sub>、  
及び③93番目のT<sub>yr</sub>から106番目のT<sub>yr</sub>である請求項1記

載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

28. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5048として寄託されているハイブリドーマNOK5が產生する抗体と同等であり、(2)L鎖の超可変領域が配列表の配列番号17で表されるアミノ酸配列の①24番目のLysから34番目のAla、②50番目のTyrから56番目のThr、及び③89番目のGlnから97番目のThrである請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

10 29. 請求項19ないし28のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメントのH鎖またはL鎖の超可変領域をコードする部分を少なくとも含むDNAまたはRNA。

30. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044として寄託されているハイブリドーマNOK1が產生する抗体と同等であり、(2)H鎖の可変領域が配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

31. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044として寄託されているハイブリドーマNOK1が產生する抗体と同等であり、(2)L鎖の可変領域が配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

25 32. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番

号 F E R M B P - 5 0 4 5 として寄託されているハイブリドーマ N O K 2 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 5 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

5 3 3. ヒト F a s リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 5 として寄託されているハイブリドーマ N O K 2 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 7 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

3 4. ヒト F a s リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 6 として寄託されているハイブリドーマ N O K 3 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 9 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

3 5. ヒト F a s リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 7 として寄託されているハイブリドーマ N O K 4 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 1 1 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

3 6. ヒト F a s リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 7 として寄託されているハイブリドーマ N O K 4 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の可変領域が配

列表の配列番号 1 3 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

37. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5048 として寄託されているハイブリドーマ NOK5 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 1 5 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

38. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5048 として寄託されているハイブリドーマ NOK5 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 1 7 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

39. 請求項 1 9 ないし 2 8 及び 3 0 ないし 3 8 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメントの変異体。

40. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044 として寄託されているハイブリドーマ NOK1 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 1 9 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

41. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044 として寄託されているハイブリドーマ NOK1 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の可変領域が配

列表の配列番号 21 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

42. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5045 として寄託されているハイブリドーマ NOK 2 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 23 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

43. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5045 として寄託されているハイブリドーマ NOK 2 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 25 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

44. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5046 として寄託されているハイブリドーマ NOK 3 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 27 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

45. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5046 として寄託されているハイブリドーマ NOK 3 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 29 で表されるアミノ酸配列である請求項 1 記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

4 6. 請求項 3 0 ないし 4 5 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメントの H鎖または L鎖の可変領域をコードする部分を少なくとも含む D N A または R N A 。

4 7. (1) 動物を、 F a s リガンド分子または F a s リガンドを発現させた細胞で免疫感作する、 (2) この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する、 (3) 該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する、 (4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する、 (5) ハイブリドーマを含有する培養上清液に分泌されている抗体が、 F a s リガンドを発現させた C O S 細胞の上清中に存在する F a s リガンドによる F a s 発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する、 (6) 所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養 15 ウエル中の細胞群をクローニングする、 (7) 所望の抗体を分泌しているクローニングを選択する、 (8) 再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローニングを樹立する、 (9) このハイブリドーマの培養上清液あるいは該ハイブリドーマをマウス腹腔内に投与して得られた腹水中 20 からモノクローナル抗体を調製する、各工程を含むことを特徴とする F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法。

4 8. 工程 (1) において、機能的な F a s 分子を発現していない動物 (ヒトを除く) に、 F a s リガンド分子または F a s リガンド発現細胞を免疫感作する請求項 4 7 記載のモノクローナル抗体の 25 製造方法。

49. 動物が、MRL 1pr/1prマウスに属する齧歯類動物である請求項48記載の製造方法。

50. 動物が、MRL gldマウスに属する齧歯類動物である請求項48記載の製造方法。

51. 細胞表面に存在するFasリガンドまたは可溶性リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマ。

52. Fasリガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、溶液中のFasリガンドを検出する方法。

53. 複数のモノクローナル抗体のうち、一種のモノクローナル抗体を担体に固定し、他種のモノクローナル抗体を標識化合物で標識し、そして、モノクローナル抗体を固定した担体をFasリガンドを含むと思われる検体の溶液に浸漬して検体を吸着させ、吸着した検体を標識化合物で標識したモノクローナル抗体により検出する請求項52記載の検出方法。

54. IgMタイプの精製したモノクローナル抗体を担体に固定し、IgGタイプのビオチン標識したモノクローナル抗体により、溶液中のFasリガンドを検出する請求項53記載の検出方法。

55. Fasリガンドに対する複数のモノクローナル抗体を組み合わせてなるFasリガンド検出用キット。

56. 伝染性単核球症(IM)、全身性エリテマトーデス(SLE)、または肝炎(Hepatitis)に罹患したヒトの血液中のFasリガンドの濃度を検出する請求項55記載のキット。



1 / 14

図 1

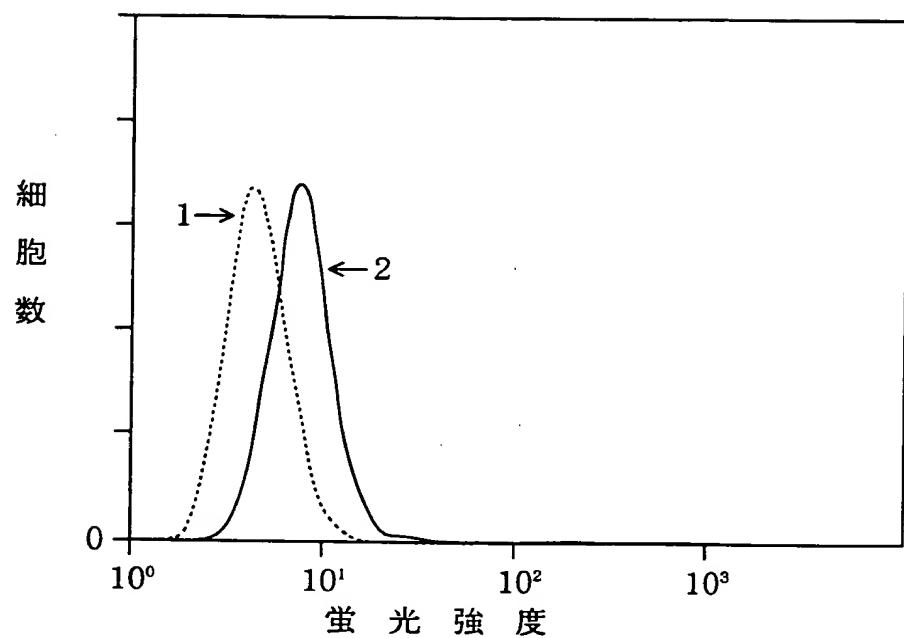
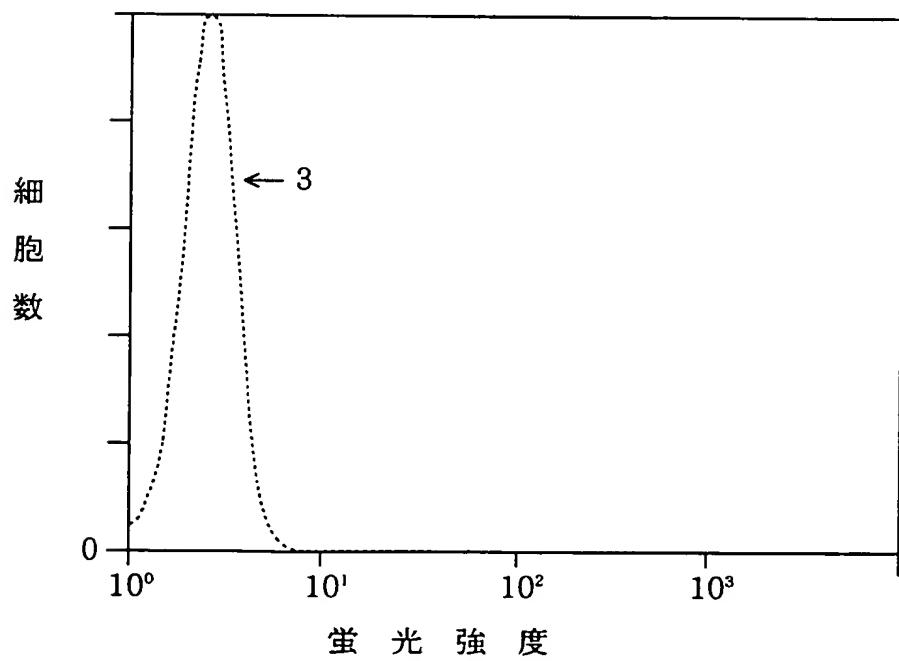


図 2



2 / 1 4

図 3

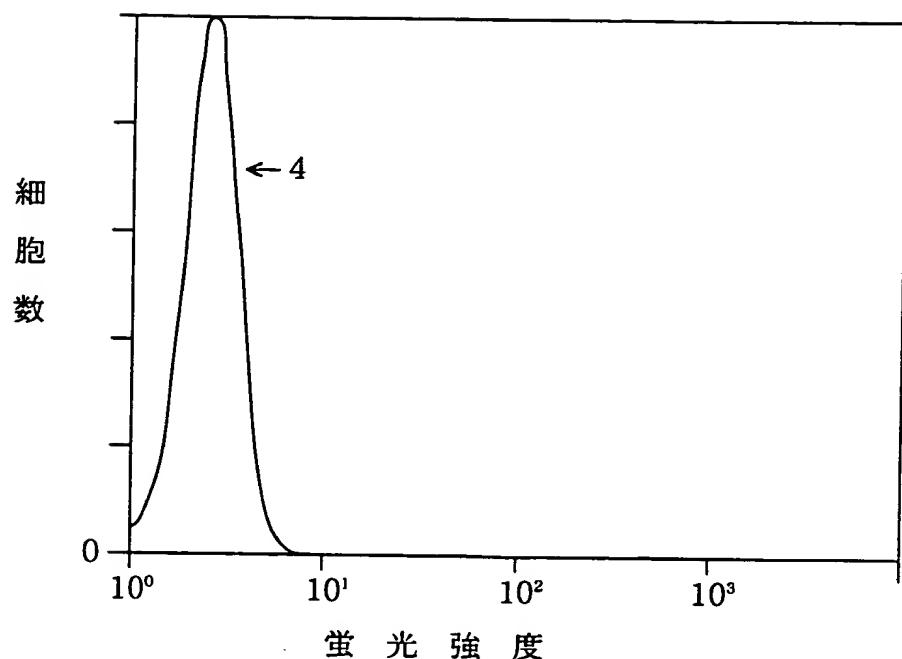
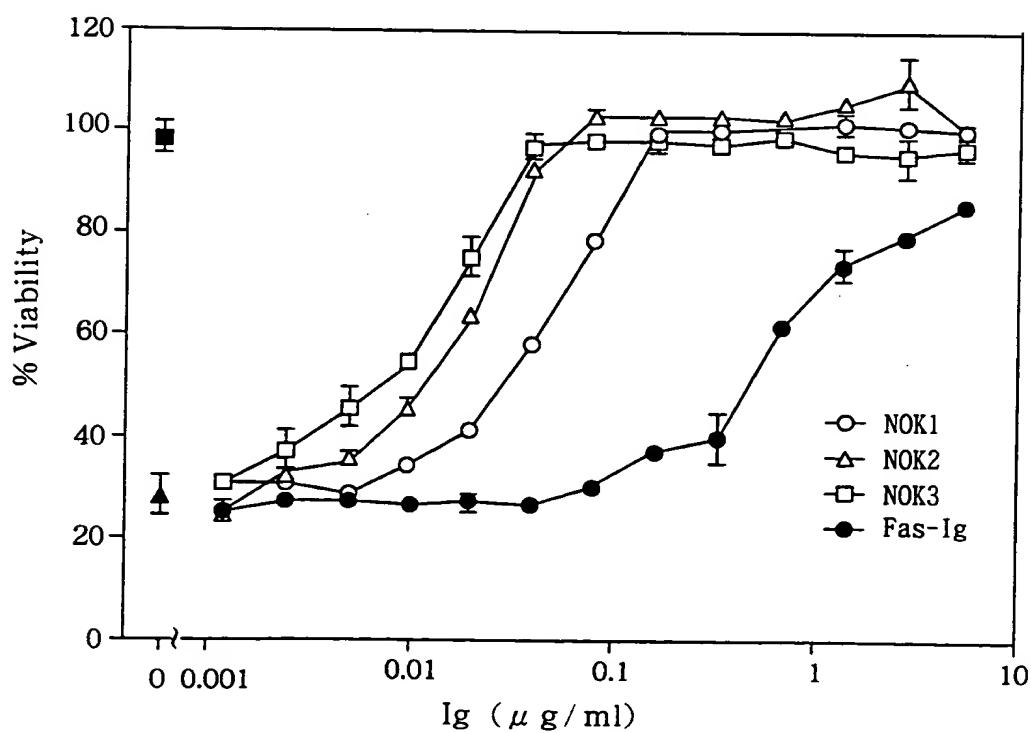


図 4



3 / 1 4

図 5

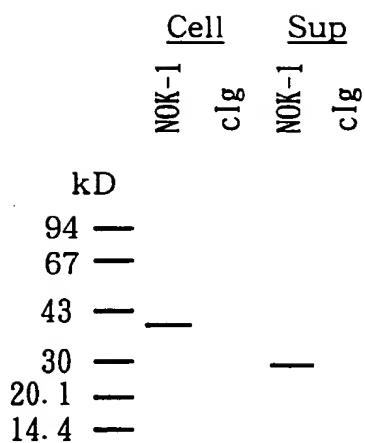
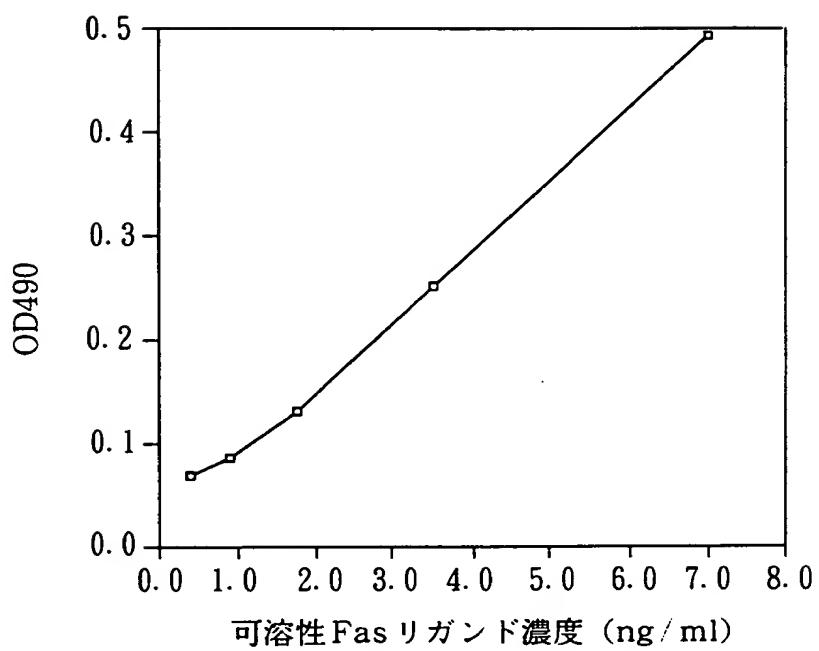


図 6



4 / 1 4

図 7

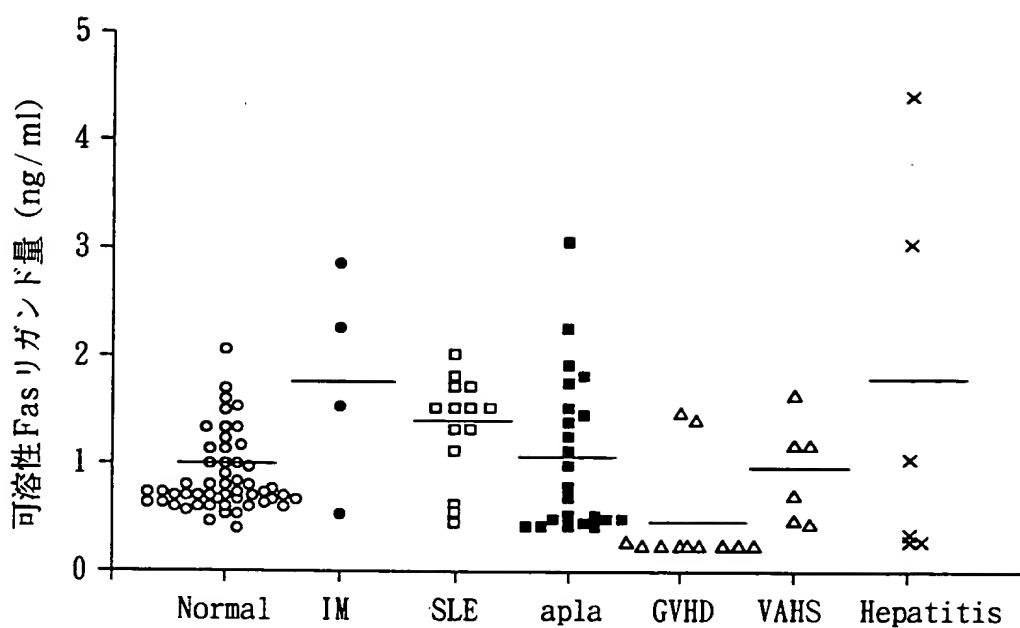
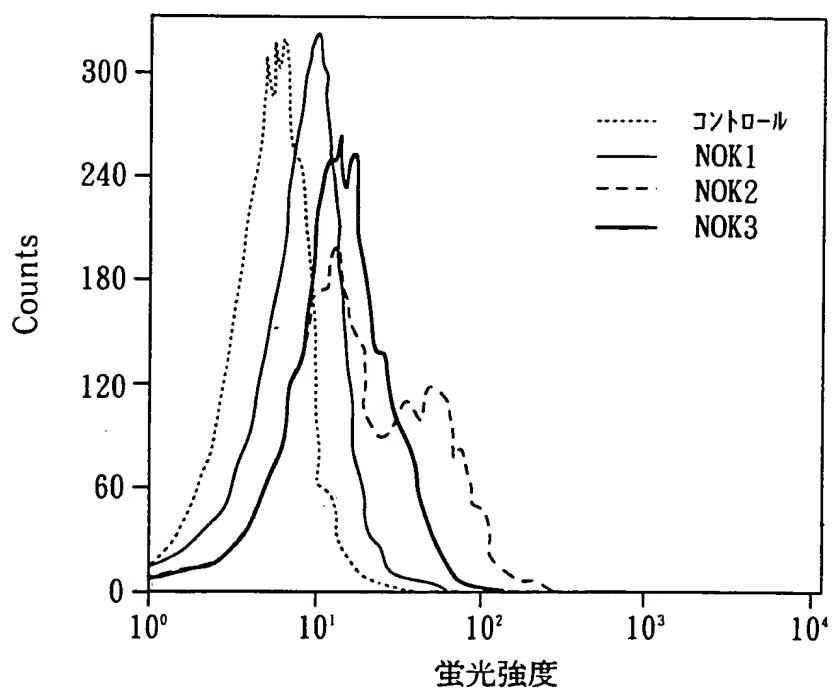


図 8



5 / 1 4

図 9

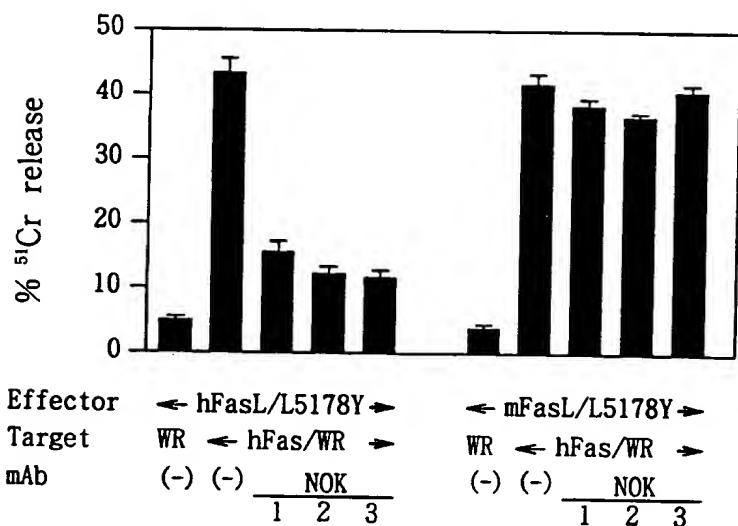
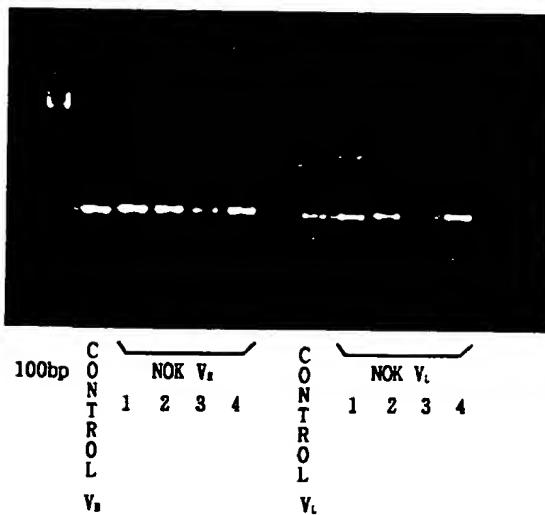


図 1 0



6 / 1 4

図 1 1



100bp  
C  
O  
N  
T  
R  
O  
L  
N  
O  
K  
4  
V  
R

図 1 2



1  
K  
b  
p  
NOK4  
V<sub>L</sub>  
NOK5  
V<sub>R</sub>  
NOK5  
V<sub>L</sub>

7 / 1 4

図 1 3

		CDR1	CDR2	
NOK1VH . amino	1:VQLQESGPELVKPGASVKISCKASGYAF--SSSWMNWVKQRPGKGLEWIGRIYPGDGDTN	58		
NOK2VH . amino	1:VQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAAGYTF--TNYWIGWVKQRPGHGLEWIGYLYPGGLYTN	58		
NOK3VH . amino	1:VKLQESGPELVKPGASVKISCKASGYAF--SSSWMNWVKQRPGKGLEWIGRIYPVNGDTN	58		
NOK4VH . amino	1:VQLQESGPGLVKPSQLSLTCVTGYSITSQYYW-NWIRQFPGNKLEWMG-YISYDGSNN	58		
NOK5VH . amino	1:VQLQESGAEPAKPGASVKMSCKASGYTF--TTYWMMHWWVKQRPGQGLEWIGYINPSSGYTE	58		
	* * * * * * * * * * * * * * * *			

		CDR3	
NOK1VH . amino	59:DNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYFCARSYYDGSPW-FTYWGQGTTVT	117	
NOK2VH . amino	59:YNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDAIYYCARYRDYD-YAMDY--WGQGTTVT	115	
NOK3VH . amino	59:YNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDAVYFCA-T---DGY-WYFDVWGQGTTVT	113	
NOK4VH . amino	59:YNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCA-VYYYDG--SSF DYWGQGTTVT	115	
NOK5VH . amino	59:YNQKFKD KATLTADKSSSTAYMQLISLTSEDAVYYCARRGNY--YYFDY--WGQGTTVT	114	
	* * * * * * * * * * * * * * * *		*****

NOK1VH . amino	118:VSS	120
NOK2VH . amino	116:VSS	118
NOK3VH . amino	114:VSS	116
NOK4VH . amino	116:VSS	118
NOK5VH . amino	115:VSS	117
	***	

8 / 14

四 1 4

四 15

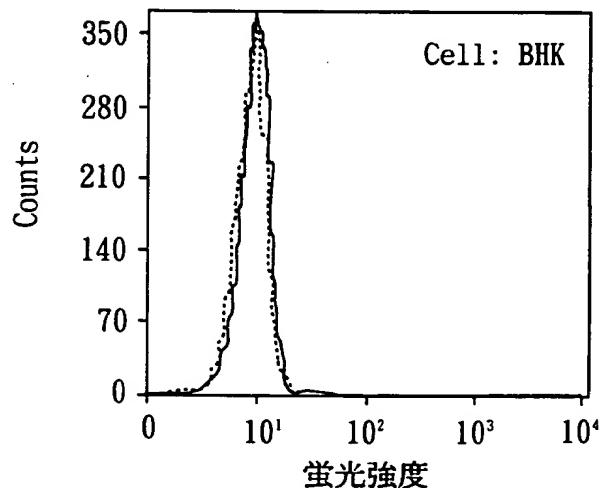
	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
NOK1VH. amino	1:QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWKQRPKGKLEWIGRIY			PGDGDTND	60
NOK2VH. amino	1:QVHLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAAGYFTNYWIGWVKQRPGHGLEWIGLY			YPGGLYTNY	60
NOK3VH. amino	1:QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWKQRPKGKLEWIGRI			YPVNGDTNY	60
	FR3	CDR3	FR4		
NOK1VH. amino	61:NGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSYYDGSPW-FTY			WGQGTLTVSA	121
NOK2VH. amino	61:NEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCARYRDYD-YAMDY-			-WGQGTSVTVSS	119
NOK3VH. amino	61:NGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAT---DGY-WYFDVWAGTTVTVSS				117

9 / 1 4

図 1 6

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
NOK1VL. amino	1:DIQMTQTTSSLASLGDRVTISCRASQDISNY-----LNWYQQKPDGTVKLLIY	YTSRLHS			56
NOK2VL. amino	1:DVVLTQTPLSLPVNIGDQASISCKSTKSLNSDGFTYLGWCLQKPGQSPQLLIYLVSNRFS				61
NOK3VL. amino	1:NI VMTQSPKSMMSMSVGERVTLSCAKASENVDIY-----VSWYQQKPEQSPKLLIYGT	TSNRYT			56
	FR3	CDR3	FR4		
NOK1VL. amino	57:GVPDRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYFCQQYSEFPWTFGGGTKEIKR				108
NOK2VL. amino	62:GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNYLPLTFGGGTKEIKR				113
NOK3VL. amino	57:GVPDRFTGSGSATDFTLTISNVQAEDLSDYYCVQSYSYWPWFGGGTKEIKR				108

図 1 7



1 0 / 1 4

図 1 8

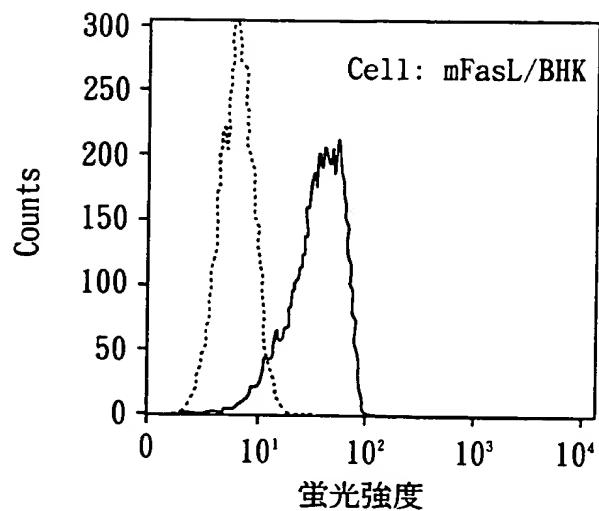
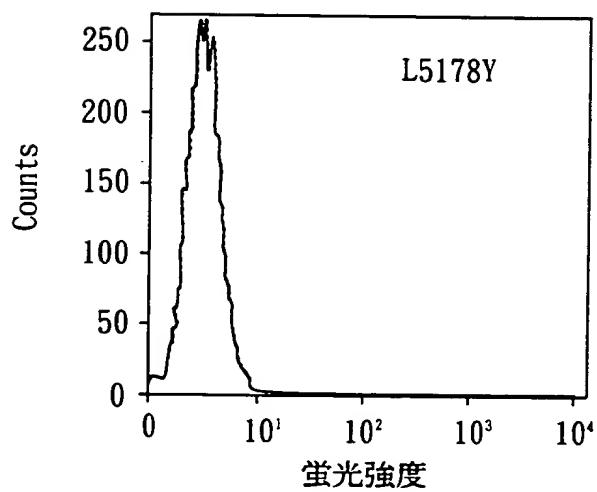


図 1 9



1 1 / 1 4

図 2 0

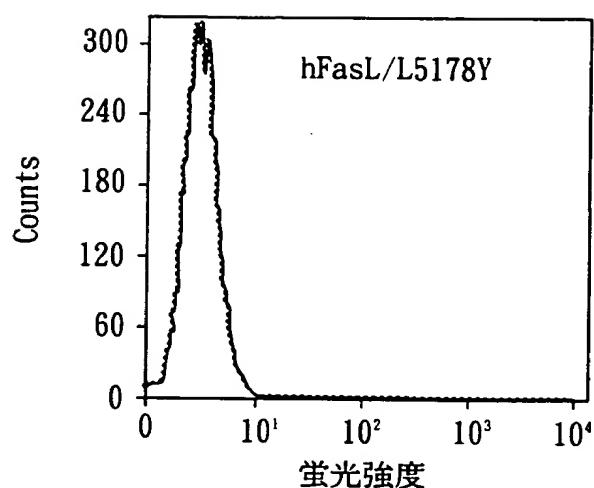
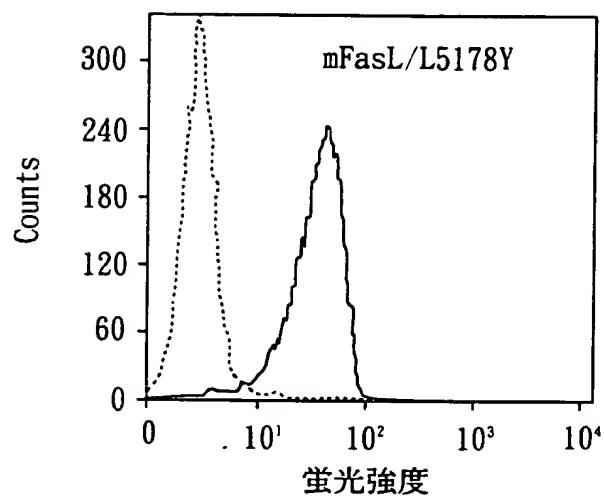


図 2 1



1 2 / 1 4

図 2 2

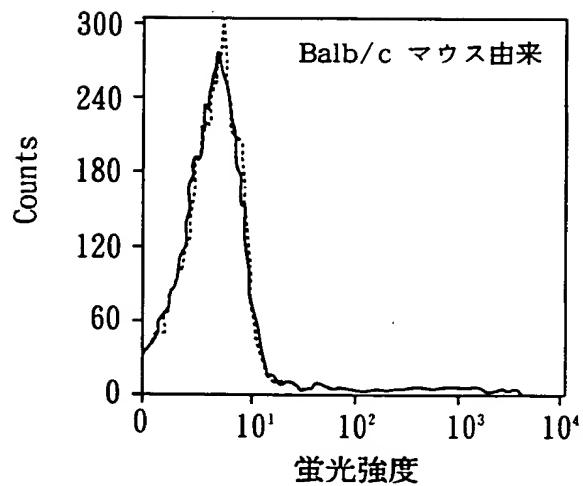
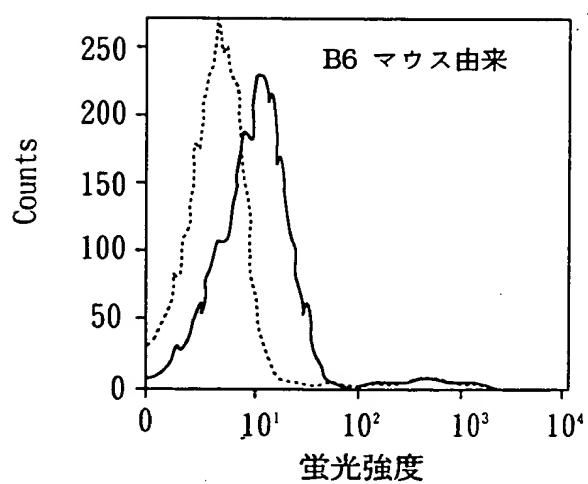


図 2 3



1 3 / 1 4

図 2 4

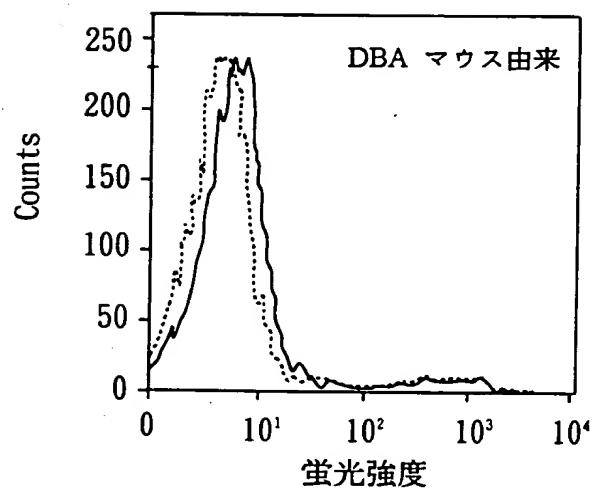
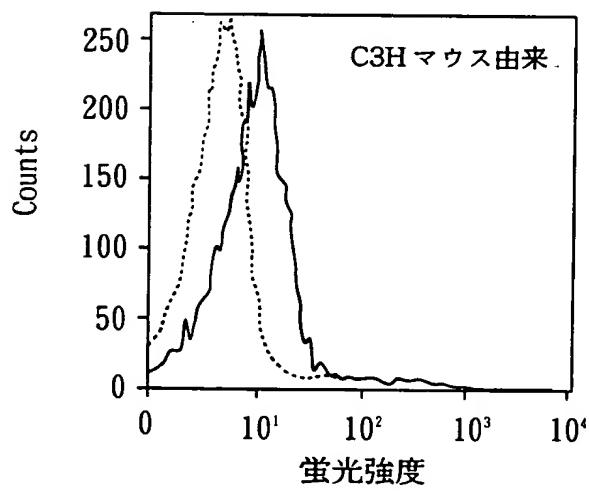


図 2 5



1 4 / 1 4

図 2 6

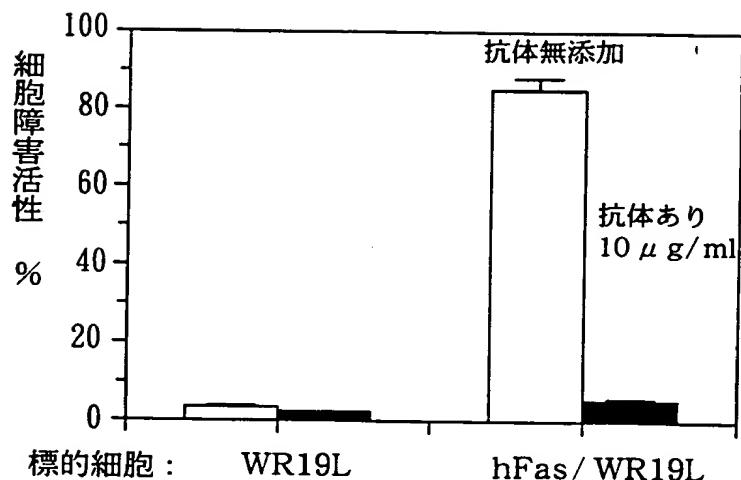
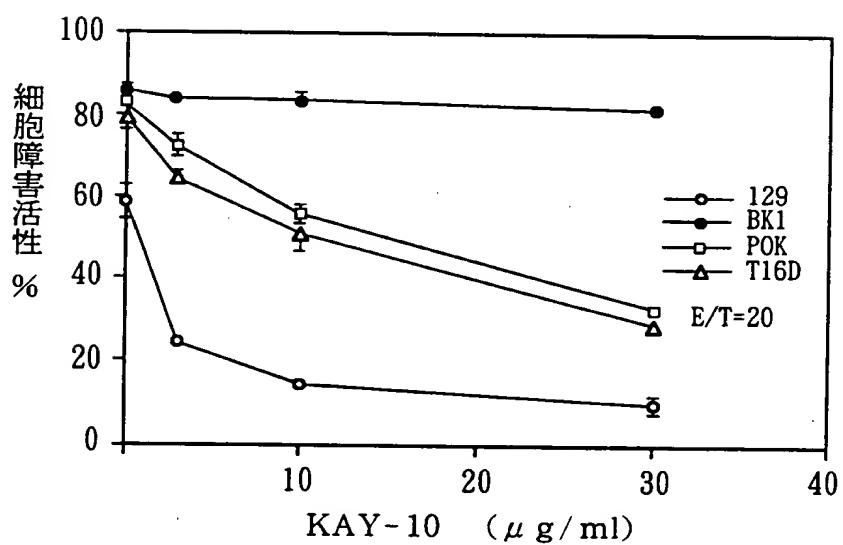


図 2 7



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00734

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C07K16/18, C12N15/13, C12N15/06, C12P21/08, C12N5/20, G01N33/577, G01N33/53, A61K39/395 // (C12P21/08, C12R1:91)  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/02-C12N15/90, C12P21/00, C12P21/02, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Takahashi, T. et al. "Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity", International Immunology (1994) Vol. 6, No. 10, p. 1567-1574	1-5, 17, 18, 47, 51-56
X	Takahashi, T. et al. "Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand", Cell (1994) Vol. 76, p. 969-976	1, 3-5, 17, 18, 47, 51-56
X	Suda, T. et al. "Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis", J. Exp. Med. (1994) Vol. 179, No. 3, p. 873-879	1, 5, 17, 18, 47, 51-56
P, X	WO, 95/13293, A (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), May 18, 1995 (18. 05. 95) & AU, 9481158, A & EP, 675200, A	1-7, 9-18, 47, 51-56
P, X	WO, 95/18819, A (IMMUNEX CORPORATION),	1-7, 9-18,

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
June 18, 1996 (18. 06. 96)Date of mailing of the international search report  
June 25, 1996 (25. 06. 96)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office  
Facsimile No.Authorized officer  
Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/00734

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	July 13, 1995 (13. 07. 95) & AU, 9515632, A	47, 51-56
A	Takashi Suda, et al. "The structure and function of Fas-ligand" Cell technology (1994) Vol. 13, No. 8, p. 738-744	1 - 56

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C07K 16/18, C12N 15/13, C12N 15/06, C12P 21/08, C12N 5/20, G01N 33/577, G01N 33/53, A61K 39/395  
// (C12P 21/08, C12R 1:91)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C12N 15/02 - C12N 15/90, C12P 21/00, C12P 21/02, C12P 21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Takahashi, T. et al. "Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity", International Immunology (1994) 第6巻, 第10号, p. 1567 - 1574	1-5, 17, 18, 47, 51-56
X	Takahashi, T. et al. "Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand", Cell (1994) 第76巻, p. 969 - 976	1, 3-5, 17, 18, 47, 51-56
X	Suda, T. et al. "Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis", J. Exp. Med. (1994) 第179巻, 第3号, p. 873 - 879	1, 5, 17, 18, 47, 51-56

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 06. 96

国際調査報告の発送日

25.06.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

佐伯 裕子

三  
印

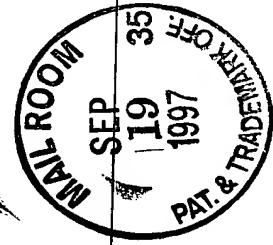
4 B 9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/00734

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO, 95/13293, A (持田製薬株式会社) 18.5月. 1995 (18.05.95) &AU, 9481158, A &EP, 675200, A	1-7, 9-18, 47, 51-56
P, X	WO, 95/18819, A (IMMUNEX CORPORATION) 13.7月. 1995 (13.07.95) &AU, 9515632, A	1-7, 9-18, 47 51-56
A	須田, 貴司, et al. "Fasリガンドの構造と機能", 細胞工学 (1994) 第13巻, 第8号, p. 738-744	1-56



## 特許協力条約

PCT

## 国際予備審査報告

REC'D 18 APR 1997

WIPO

PCT

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT 36条及びPCT規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 SD-239	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP96/00734	国際出願日 (日.月.年) 21.03.96	優先日 (日.月.年) 20.03.95
国際特許分類 (IPC) C07K 16/18, C12N 15/13, C12N 15/06, C12P 21/08, C12N 5/20, G01N 33/577, Int.Cl <sup>®</sup> G01N 33/53, A61K 39/395 // (C12P 21/08, C12R 1:91)		
出願人（氏名又は名称） 住友電気工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT 36条）の規定に従い送付する。

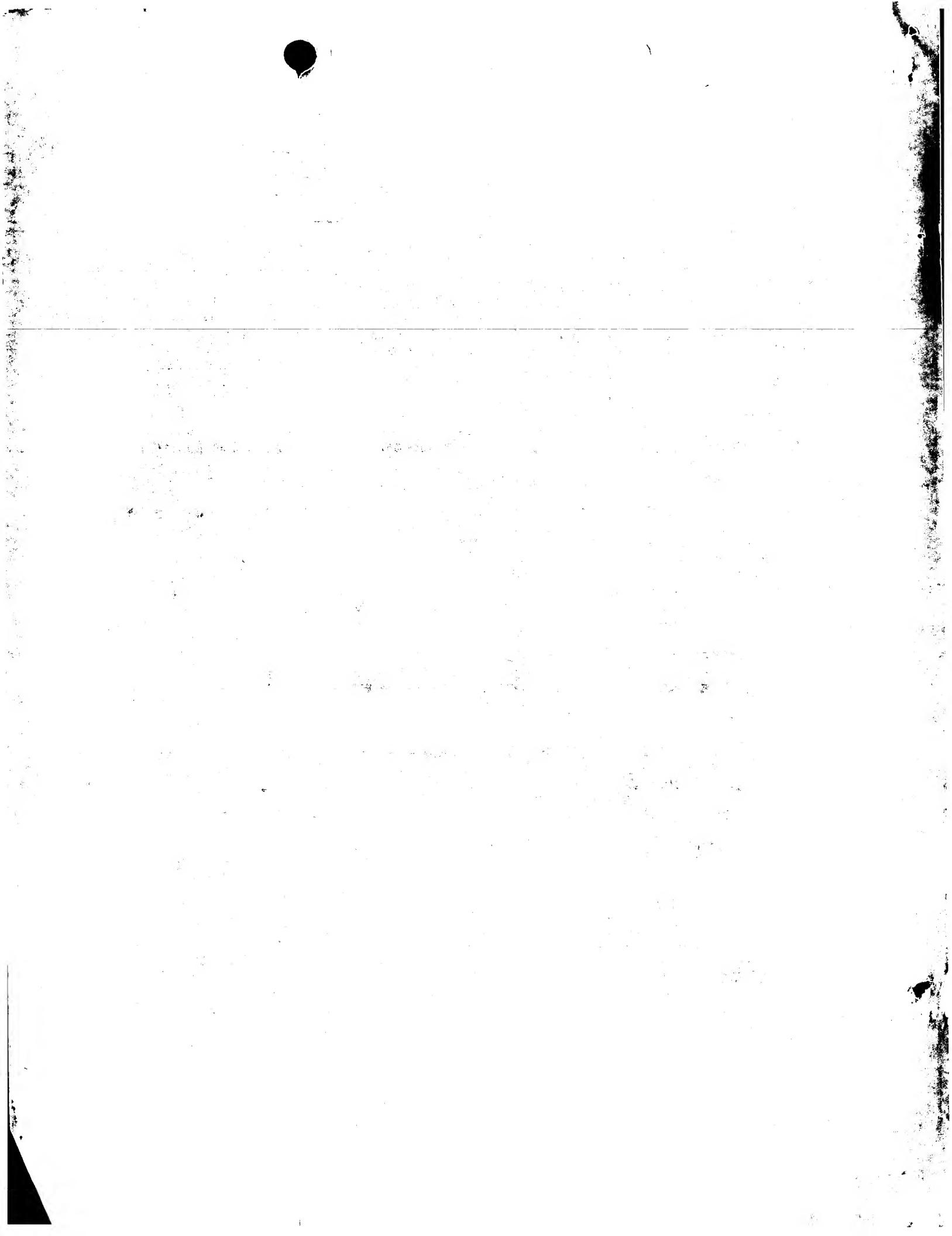
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で 16 ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I  国際予備審査報告の基礎
- II  優先権
- III  新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV  発明の單一性の欠如
- V  PCT 35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI  ある種の引用文献
- VII  国際出願の不備
- VIII  国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 16.07.96	国際予備審査報告を作成した日 03.04.97
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許序審査官（権限のある職員） 小暮 道明  電話番号 03-3581-1101 内線 3449
	4B 9358



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とする)

 出願時の国際出願書類

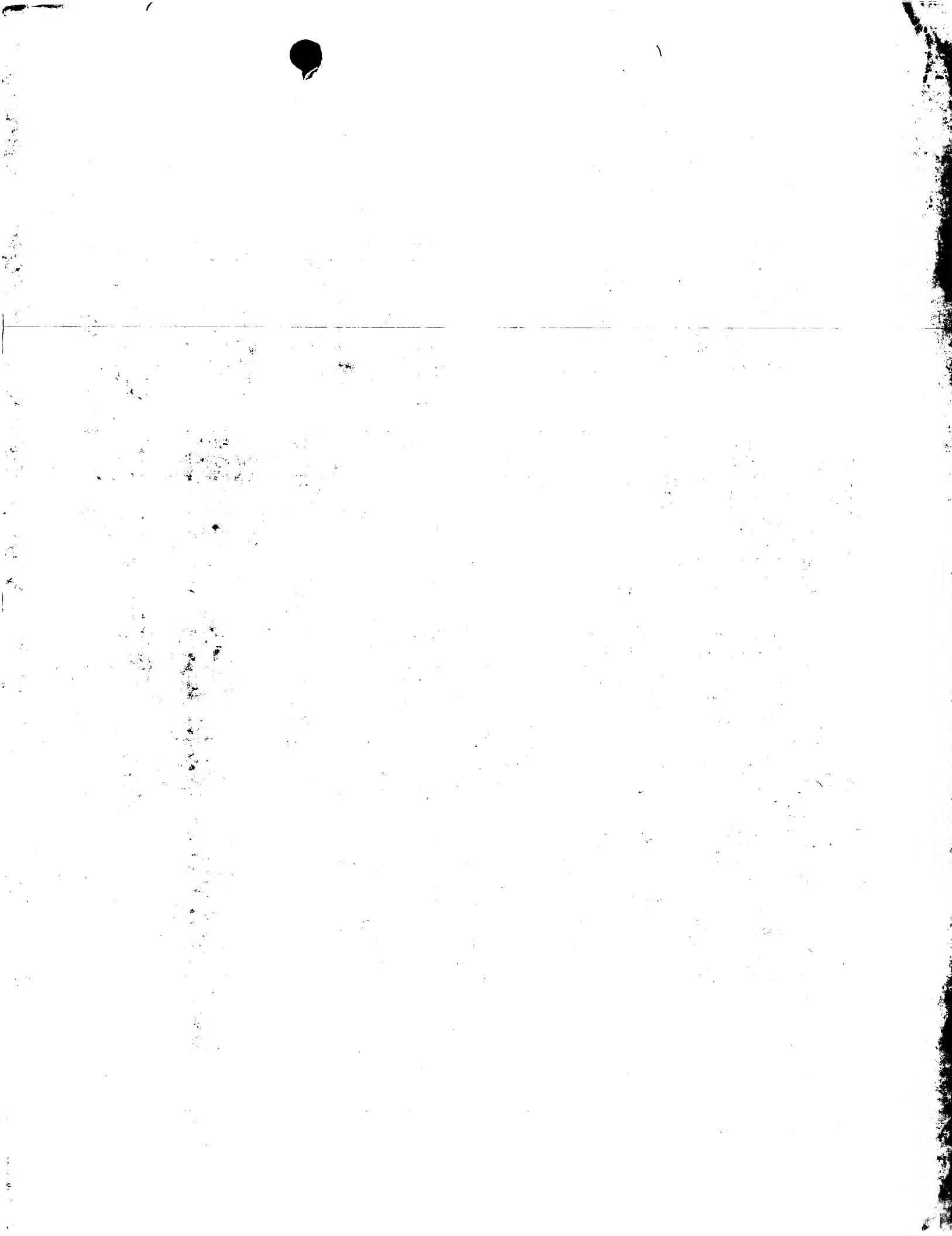
<input checked="" type="checkbox"/> 明細書	第 1-23, 25-31, 34-101	ページ、	出願時のもの 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
明細書	第 24, 32, 32/1, 33	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
明細書	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	出願時に提出されたもの PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲	第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲	第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
請求の範囲	第 1-50	項、	付の書簡と共に提出されたもの
請求の範囲	第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input checked="" type="checkbox"/> 図面	第 1-14	ページ/図、	出願時に提出されたもの 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面	第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
図面	第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
図面	第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 補正により、下記の書類が削除された。

<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ
<input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲	第 51-56	項
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図

3.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

4. 追加の意見(必要ならば)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条 (P C T 35条(2)) に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1 - 5 0 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

進歩性 (I S)

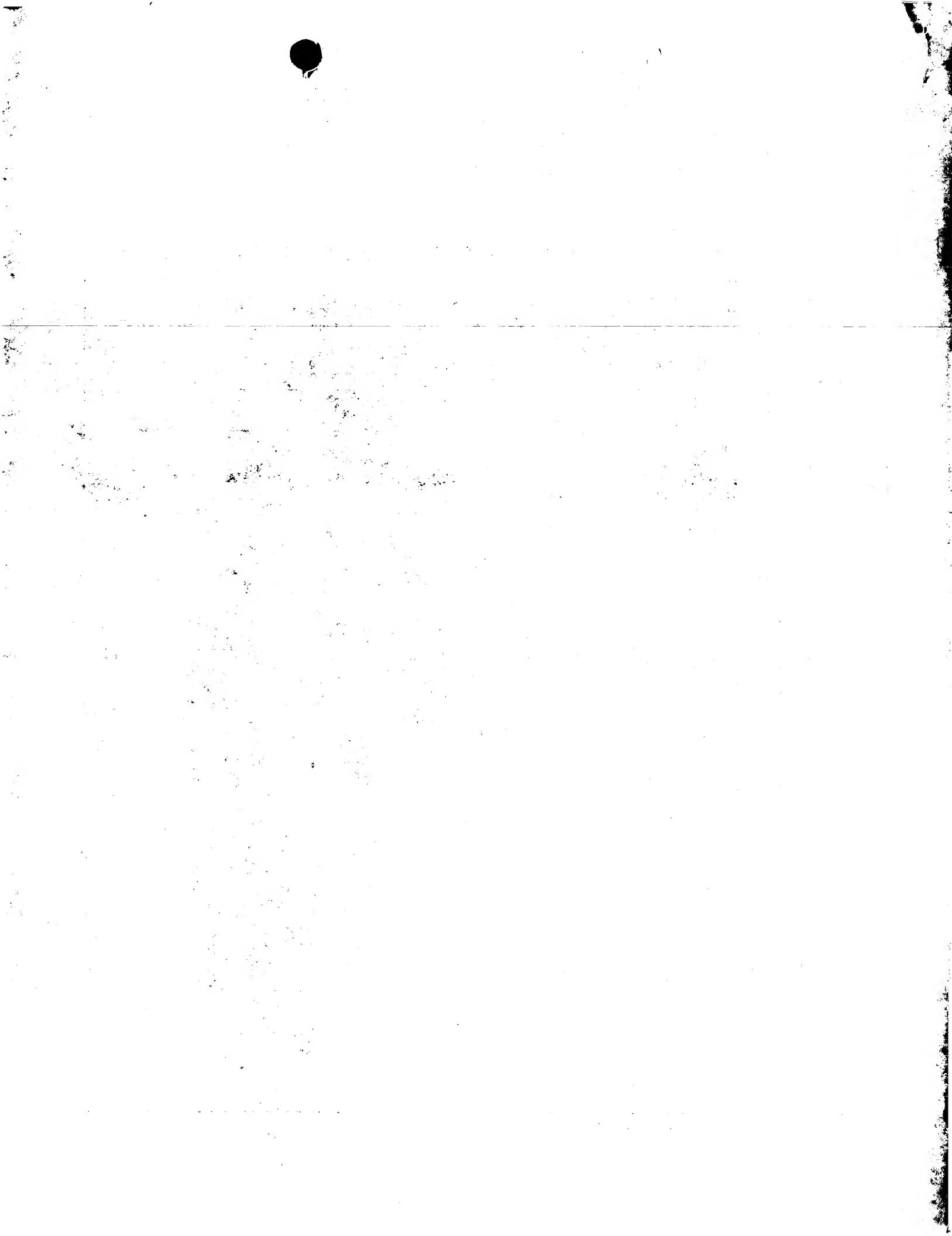
請求の範囲 1 - 5 0 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲 1 - 5 0 有  
請求の範囲 \_\_\_\_\_ 無

2. 文献及び説明

請求の範囲第1 - 5 0 に記載された発明は、国際調査報告に列記された何れの文献にも記載されておらず、  
また、当業者にとって自明なものでもない。



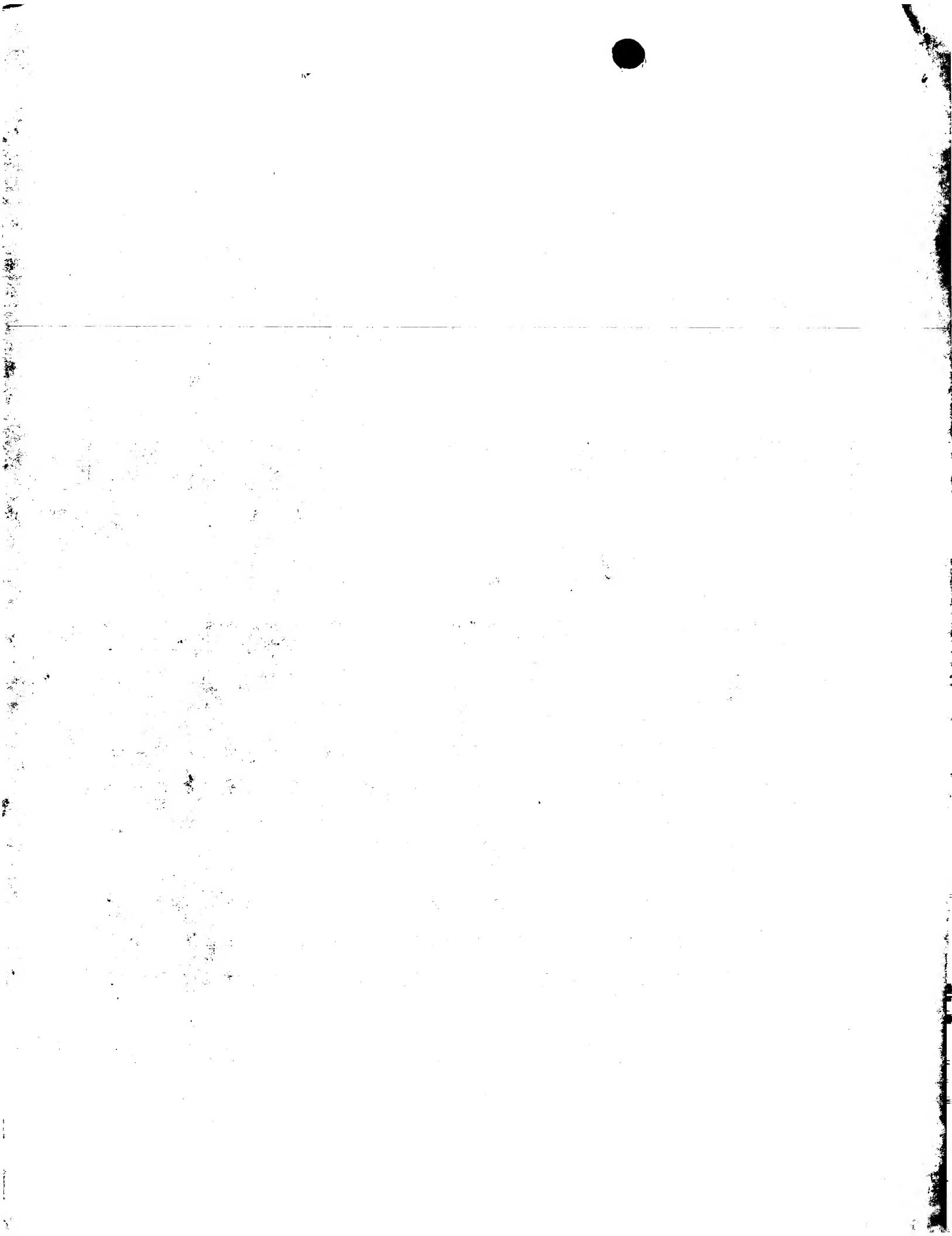
## VI. ある種の引用文献

## 1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日. 月. 年)	出願日 (日. 月. 年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日. 月. 年)
PCT/JP94/01899	(18. 05. 95)	(10. 11. 94)	(10. 11. 93)
PCT/US95/00362	(13. 07. 95)	(06. 01. 95)	(07. 01. 94)

## 2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日. 月. 年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日. 月. 年)



抗体 (K A Y - 1 0 抗体) は、 M A L g l d マウスに F a s リガンドを発現している C O S 細胞を免疫感作して得られたものである。 M R L g l d マウスの M H C クラス II は H - 2<sup>d</sup> であり、 K A Y - 1 0 が反応しない F a s リガンドが由来する B a l b / c マウスや 5 D B A マウスの M H C クラス II も H - 2<sup>d</sup> であり、同じである。一方、 K A Y - 1 0 が反応する F a s リガンドが由来する B 6 マウス、 C 3 H マウスの M H C クラス II は、それぞれ H - 2<sup>b</sup> 、 H - 2<sup>k</sup> である。

本発明のモノクローナル抗体を複数 (例えば、2種類) 組み合わせて用いることにより、溶液 (血液、培養上清液、体液、尿液など) 10 中の F a s リガンドを検出 (さらには定量) することができる。複数のモノクローナル抗体のうち、一種のモノクローナル抗体を担体に固定し、他種のモノクローナル抗体を標識化合物で標識し、そして、モノクローナル抗体を固定した担体を F a s リガンドを含むと思われる検体の溶液と接触させて検体を吸着させ、吸着した検体を 15 標識化合物で標識したモノクローナル抗体により検出する検出方法が好ましい。なお、担体としては、 E L I S A プレートが好ましい。

より具体的には、 I g M タイプの精製したモノクローナル抗体を 20 プレートに固定し、 I g G タイプのビオチン標識したモノクローナル抗体により、溶液中の F a s リガンドを検出する方法を挙げることができる。例えば、 I g M タイプの精製した F a s リガンドに対する抗体をプレートに固定し、ビオチン標識した I g G タイプの F a s リガンドに対する抗体で検出するという方法で、溶液中の F a s リガンド分子は、濃度が 1 n g / m l 以上のものを検出することができる。

25 さらに詳細には、例えば、 I g M タイプである N O K 3 抗体の精製抗体を P B S (リシ酸緩衝生理食塩水) で 1 0  $\mu$  g / m l 溶液に



18) であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

また、本発明によれば、前記モノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、前記1～5のいずれか1項に記載のH鎖またはL鎖の超可変領域をコードする部分を少なくとも含むDNAまたはRNAが提供される。  
5

さらに、本発明によれば、前記モノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、前記6～10のいずれか1項に記載のH鎖またはL鎖の可変領域をコードする部分を少なくとも含むDNAまたはRNAが提供される。

10 本発明によれば、各モノクローナル抗体またはその活性フラグメントの変異体が提供される。ここで、変異体という用語は、この技術分野で一般に用いられている意味で用いられ、具体的には、各配列番号で表される各アミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、しかもなお、モノクローナル抗体またはその活性フラグメントの機能（アポトーシス抑制機能）が維持されているものを言う。  
15

これらの変異体の具体例としては、以下のものが例示される。

11. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 4として寄託されているハイブリドーマNOK1が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号19で表されるアミノ酸配列(DNA配列は、配列番号20)であり、及び／または(3) L鎖の可変領域が配列表の配列番号21で表されるアミノ酸配列(DNA配列は、配列番号22)であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。  
20  
25

12. ヒトFasリガンドに対する抗体であって、(1) その



32/1

アポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託  
番号 F E R M B P - 5 0 4 5 として寄託されているハイブリドー  
マ N O K 2 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が  
配列表の配列番号 23 で表されるアミノ酸配列 (D N A 配列は、配

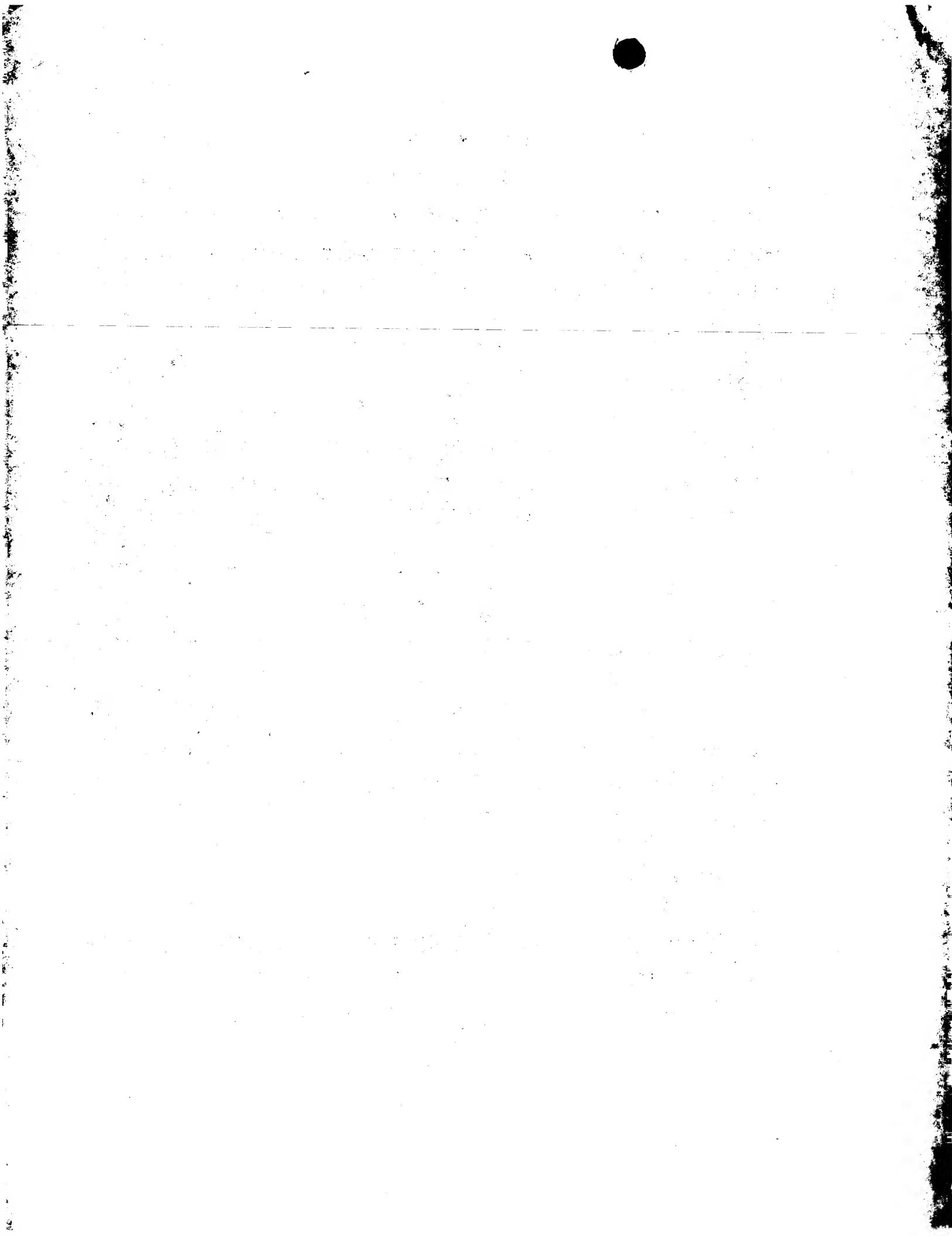
5

10

15

20

25



列番号 24) であり、及び／または (3) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 25 で表されるアミノ酸配列 (DNA配列は、配列番号 26) であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

13. ヒト Fas リガンドに対する抗体であって、(1) その  
5 アポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託  
番号 FERM BP-5046 として寄託されているハイブリドーマ NOK3 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が  
配列表の配列番号 27 で表されるアミノ酸配列 (DNA配列は、配  
列番号 28) であり、及び／または (3) L鎖の可変領域が配列表  
10 の配列番号 29 で表されるアミノ酸配列 (DNA配列は、配列番号  
30) であるモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

また、本発明によれば、前記モノクローナル抗体またはその活性  
フラグメントであって、前記 11～13 のいずれか 1 項に記載の H  
鎖または L鎖の可変領域をコードする部分を少なくとも含む DNA  
15 または RNA が提供される。

### 【実施例】

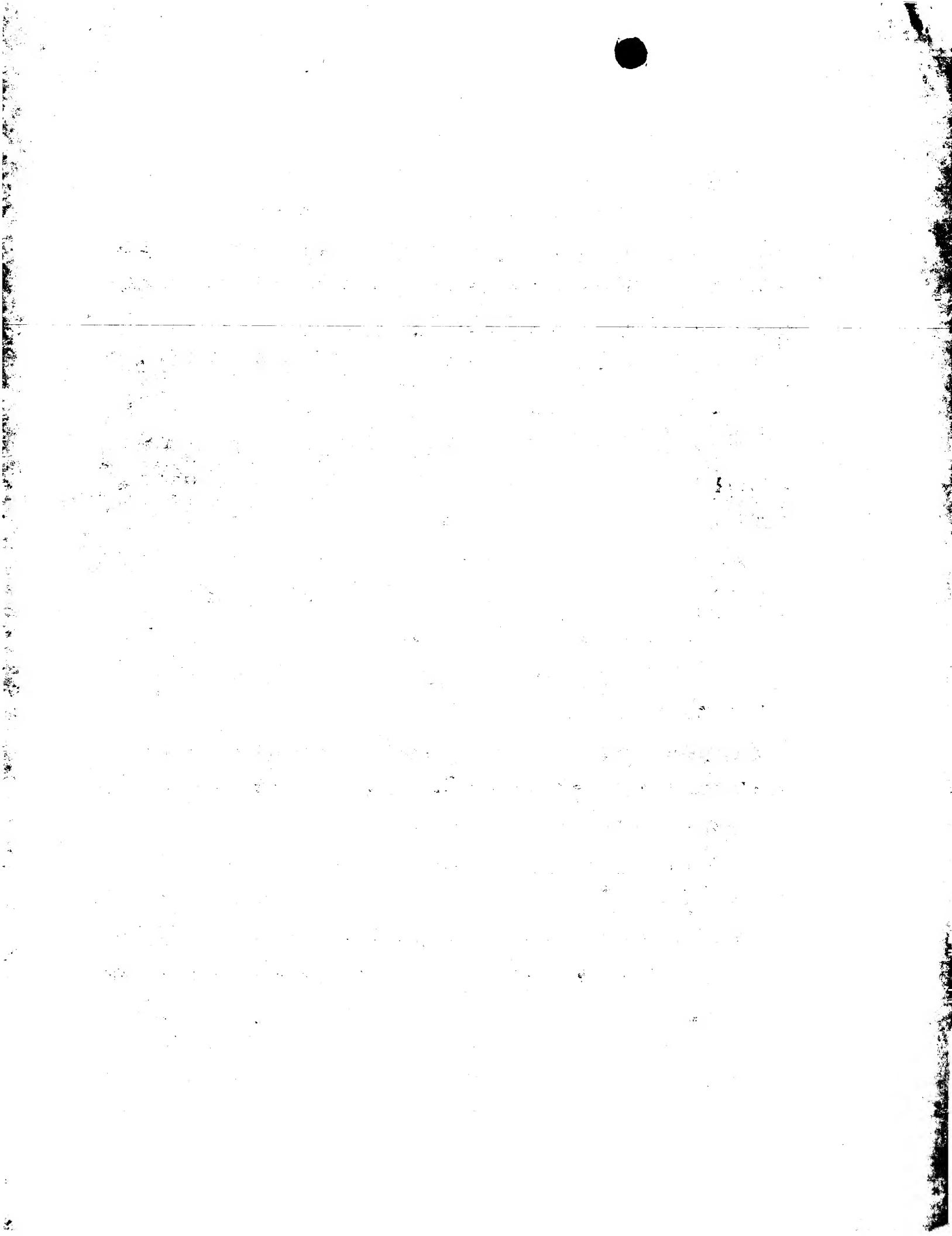
以下に実施例を挙げて、本発明についてより具体的に説明するが、  
本発明は、これらの実施例のみに限定されるものではない。

#### [実施例 1] モノクローナル抗体の作製及び特性化

20 (1) Fas リガンド遺伝子の単離

##### ① プライマーの調製

ヒト Fas リガンドの遺伝子は、Nagata et al. の  
報告をもとに単離した。すなわち、ヒト Fas リガンド cDNA の  
5' 末端側では、Xho-I サイトの配列にヒト Fas リガンド 5



請求の範囲

1. Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、アポトーシスの抑制活性がFas-Igキメラ分子よりも高いことを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。  
5
2. 0.01~8 μg/mlの濃度（実効濃度）において、Fas-Igキメラ分子に比べて高いアポトーシスの抑制活性を示す請求項1記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。  
10
3. Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、可溶性FasリガンドがFas発現細胞に対して引き起こすアポトーシスを90%以上のアポトーシス抑制率（ただし、アポトーシス抑制率とは、Fasリガンドを遺伝子導入した細胞の培養上清の12倍希釈液中に含まれる可溶性Fasリガンドをエフェクター分子とし、一方、Fasを遺伝子導入した細胞をターゲット細胞とし、両者を96ウェルプレート中で100 μlの反応系で反応させ、ターゲット細胞の16時間後の生存率を生細胞数検出試薬を用いて測定する細胞障害反応試験において、抗体を添加したときのターゲット細胞の生存率である。）で抑制することを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。  
15
4. Fasリガンドを遺伝子導入した細胞の培養上清の12倍希釈液中に含まれる可溶性Fasリガンドをエフェクター分子とし、その希釈液25 μlを用い、一方、Fasを遺伝子導入した細胞（Fas/WR19L）をターゲット細胞とし、該細胞の濃度2×105/ml液50 μlを用い、そして、前記モノクローナル抗体を含むハイブリドーマの培養上清25 μlを用い、これらのすべてを混合した後、37°Cで16時間反応させたとき、ターゲット細胞の生存率（すなわち、アポトーシス抑制率）を90%以上とすることができる請求項3記載のモノクローナル抗体ま  
20



たはその活性フラグメント。

5. Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、FasリガンドとFasとの生理的反応を抑制する点において、ヒトのFasリガンドの生理的反応は抑制することができるが、マウスのFasリガンドの生理的反応は抑制できないことを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

6. Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、FasリガンドとFasとの生理的な反応よりも強くFasリガンドと結合することができることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

7. Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、当該抗体を得るためにFasリガンドを免疫感作したマウスのMHCクラスIIのタイプと同じタイプに分類されるマウス由来のFasリガンドには反応しないことを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

8. Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、ヒトの細胞上のFasリガンドあるいは可溶性Fasリガンドを認識し、かつ、サルの細胞表面上のFasリガンドをも認識することができることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

9. Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、

(1) 機能的なFas分子を発現していない動物（ヒトを除く）を、Fasリガンド分子またはFasリガンド発現細胞で免疫感作する、(2) この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する、(3) 該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する、(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合し



たハイブリドーマを選別する、(5)ハイブリドーマを含有する培養上清液に分泌されている抗体が、Fasリガンドを発現させたCOS細胞の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する、

5 (6)所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養ウエル中の細胞群をクローニングする、(7)所望の抗体を分泌しているクローンを選択する、(8)再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローンを樹立する、及び(9)このハイブリドーマの培養上清液あるいは該ハイブリドーマをマウス腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する、各工程を含む方法により製造されることを特徴とするFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

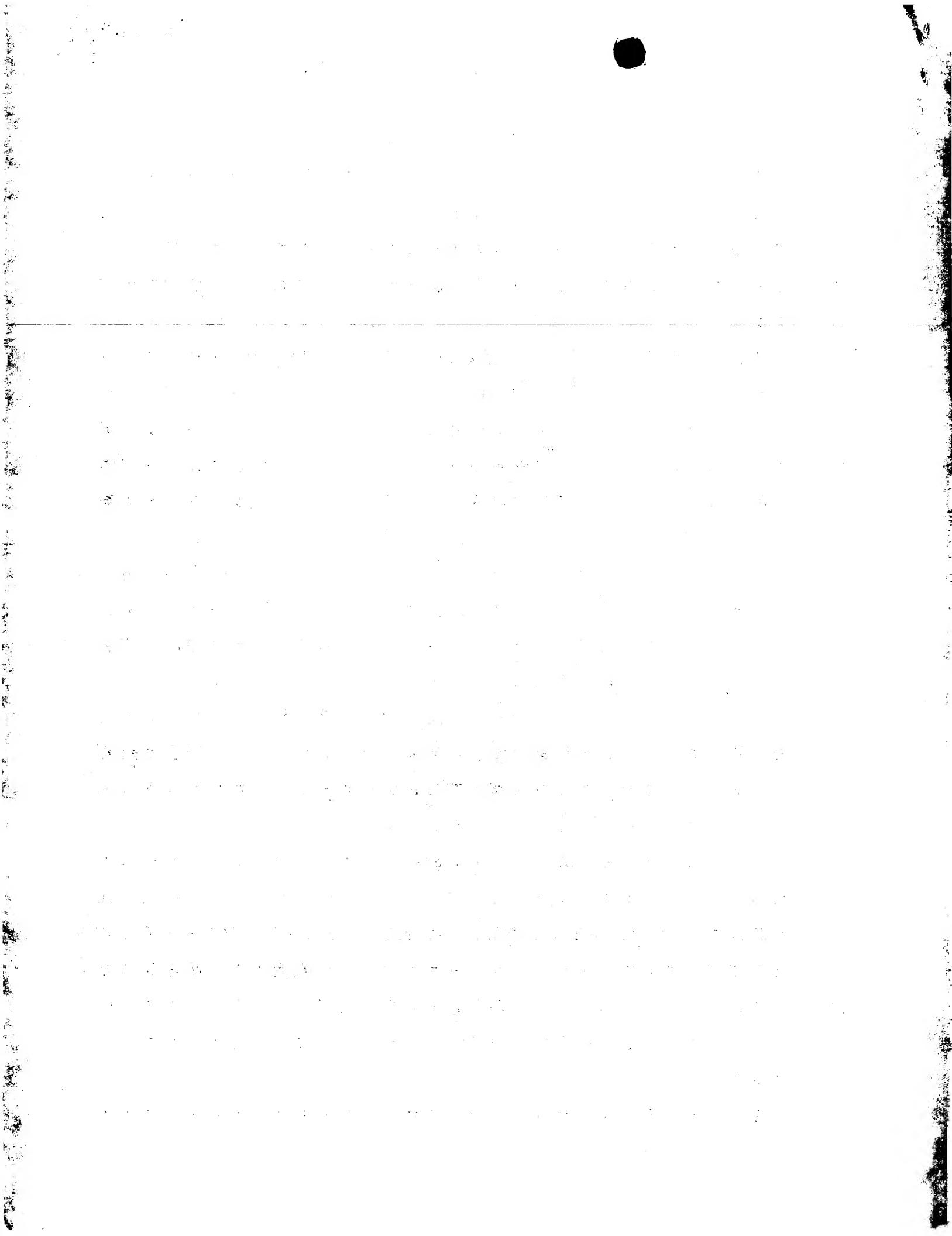
10 10. 動物が、MRL 1pr/1prマウスに属する齧歯類動物である請求項9記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

15 11. 動物が、MRL gldマウスに属する齧歯類動物である請求項9記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

12. Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、Fasリガンドにおける配列表の配列番号31で表されるアミノ酸配列部分と反応することを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

20 13. ヒトFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1)そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044として寄託されているハイブリドーマNOK1が産生する抗体と同等であり、(2)H鎖の可変領域が配列表の配列番号1で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

25 14. ヒトFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体ま



たはその活性フラグメントであって、（1）そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 4として寄託されているハイブリドーマN O K 1が產生する抗体と同等であり、（2）L鎖の可変領域が配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

15. ヒトF a sリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、（1）そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 5として寄託されているハイブリドーマN O K 2が產生する抗体と同等であり、（2）H鎖の可変領域が配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

16. ヒトF a sリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメント抗体であって、（1）そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 5として寄託されているハイブリドーマN O K 2が產生する抗体と同等であり、（2）L鎖の可変領域が配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

17. ヒトF a sリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、（1）そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 6として寄託されているハイブリドーマN O K 3が產生する抗体と同等であり、（2）H鎖の可変領域が配列表の配列番号9で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

18. ヒトF a sリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体ま  
補正された用紙(条約第34条)



たはその活性フラグメント抗体であって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 7 として寄託されているハイブリドーマ N O K 4 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 1 1 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

19. ヒト F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 7 として寄託されているハイブリドーマ N O K 4 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 1 3 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

20. ヒト F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 8 として寄託されているハイブリドーマ N O K 5 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 1 5 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

21. ヒト F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 8 として寄託されているハイブリドーマ N O K 5 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 1 7 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

22. 請求項 1 3 ないし 2 1 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル



抗体またはその活性フラグメントの変異体。

23. ヒト F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 4 5 として寄託されているハイブリドーマ N O K 1 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 1 9 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

24. ヒト F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 4 として寄託されているハイブリドーマ N O K 1 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 2 1 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

25. ヒト F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 5 として寄託されているハイブリドーマ N O K 2 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 2 3 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

26. ヒト F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 5 として寄託されているハイブリドーマ N O K 2 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 2 5 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラ



グメント。

27. ヒト Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5046 として寄託されているハイブリドーマ NOK 3 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の可変領域が配列表の配列番号 27 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

28. ヒト Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5046 として寄託されているハイブリドーマ NOK 3 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の可変領域が配列表の配列番号 29 で表されるアミノ酸配列であることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

29. 請求項 13 ないし 28 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメントの H鎖または L鎖の可変領域をコードする部分を少なくとも含む DNA または RNA。

30. ヒト Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM BP-5044 として寄託されているハイブリドーマ NOK 1 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の超可変領域が配列表の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の ① 30 番目の Ser から 34 番目の Asn まで、② 49 番目の Arg から 65 番目の Gly まで、及び ③ 93 番目の Tyr または 98 番目の Ser から 109 番目の Tyr まであることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

31. ヒト Fas リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体ま

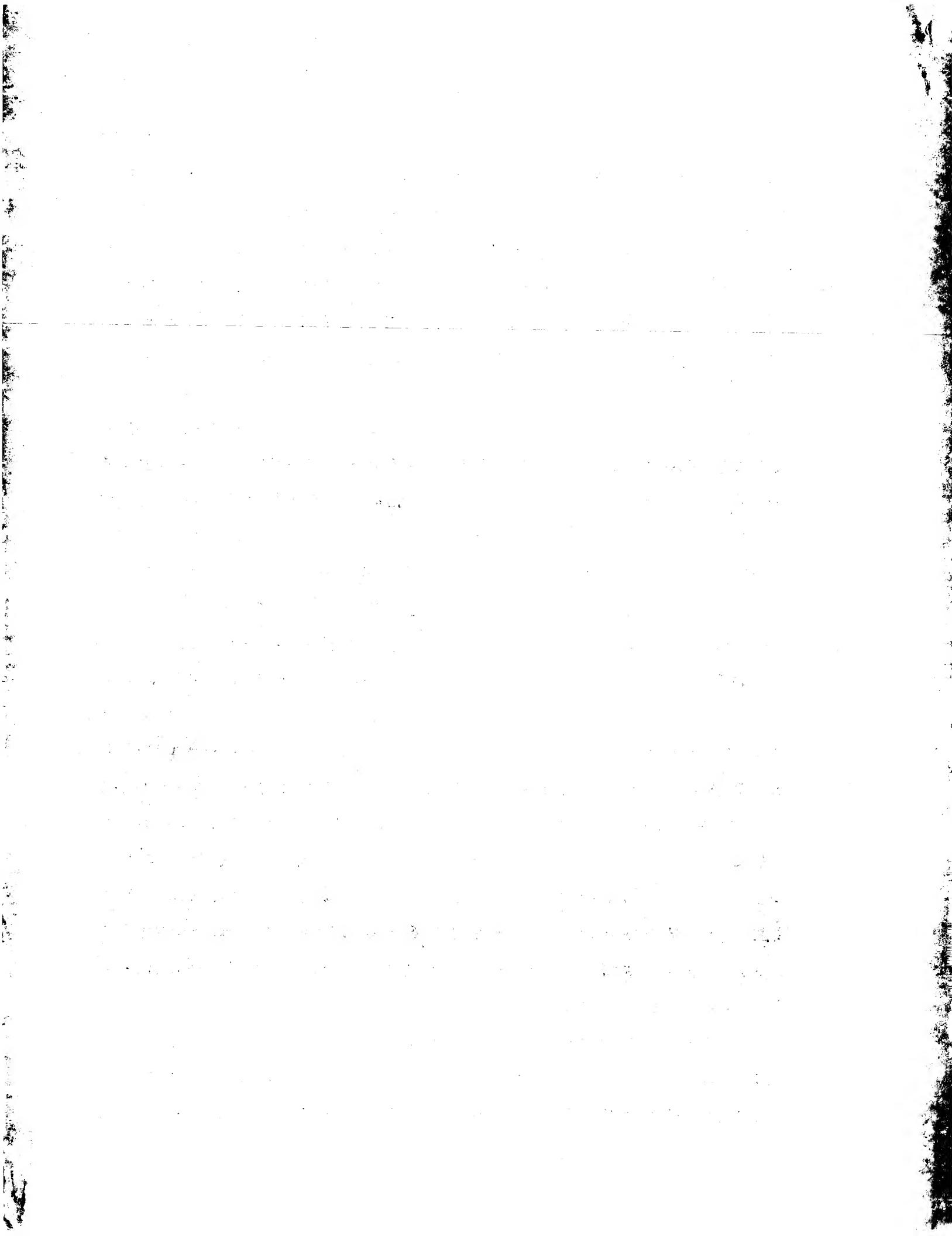


たはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 4 として寄託されているハイブリドーマ N O K 1 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の超可変領域が配列表の配列番号 3 で表されるアミノ酸配列の① 2 4 番目の A r g から 3 4 番目の A s n まで、② 5 0 番目の T y r から 5 6 番目の S e r まで、及び③ 8 9 番目の G l n から 9 7 番目の T h r まであることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

3 2. ヒト F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 5 として寄託されているハイブリドーマ N O K 2 が產生する抗体と同等であり、(2) H鎖の超可変領域が配列表の配列番号 5 で表されるアミノ酸配列の① 3 0 番目の A s n から 3 4 番目の G l y まで、② 4 9 番目の T y r から 6 5 番目の G l y まで、及び③ 9 3 番目の T y r または 9 8 番目の T y r から 1 0 7 番目の T y r まであることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

3 3. ヒト F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 5 として寄託されているハイブリドーマ N O K 2 が產生する抗体と同等であり、(2) L鎖の超可変領域が配列表の配列番号 7 で表されるアミノ酸配列の① 2 4 番目の L y s から 3 9 番目の G l y まで、② 5 5 番目の L e u から 6 1 番目の S e r まで、及び③ 9 4 番目の P h e または 9 5 番目の G l n から 1 0 2 番目の T h r まであることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

3 4. ヒト F a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、(1) そのアポトーシス抑制効果



が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 6 として寄託されているハイブリドーマN O K 3 が產生する抗体と同等で あり、 (2) H鎖の超可変領域が配列表の配列番号9で表されるアミノ 酸配列の①3 0 番目のS e r から3 4 番目のA s n まで、②4 9 番目の 5 A r g から6 5 番目のG l y まで、及び③9 3 番目のT y r または9 8 番目のA s p から1 0 5 番目のV a l まであることを特徴とするモノク ローナル抗体またはその活性フラグメント。

3 5. ヒトF a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体ま たはその活性フラグメントであって、 (1) そのアポトーシス抑制効果 10 が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 6 として寄託されているハイブリドーマN O K 3 が產生する抗体と同等で あり、 (2) L鎖の超可変領域が配列表の配列番号2 9 で表されるアミ ノ酸配列の①2 4 番目のL y s から3 4 番目のS e r まで、②5 0 番目 15 のG l y から5 6 番目のT h r まで、及び③8 9 番目のV a l または9 0 番目のG l n から9 7 番目のT h r まであることを特徴とするモノクロー ナル抗体またはその活性フラグメント。

3 6. ヒトF a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体ま たはその活性フラグメントであって、 (1) そのアポトーシス抑制効果 20 が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 7 として寄託されているハイブリドーマN O K 4 が產生する抗体と同等で あり、 (2) H鎖の超可変領域が配列表の配列番号1 1 で表されるアミ ノ酸配列の①3 2 番目のT y r から3 5 番目のA s n まで、②5 0 番目 25 のT y r から6 5 番目のA s n まで、及び③9 3 番目のT y r から1 0 7 番目のT y r まであることを特徴とするモノクローナル抗体またはその 活性フラグメント。

3 7. ヒトF a s リガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体ま たはその活性フラグメントであって、 (1) そのアポトーシス抑制効果 が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号F E R M B P - 5 0 4 7



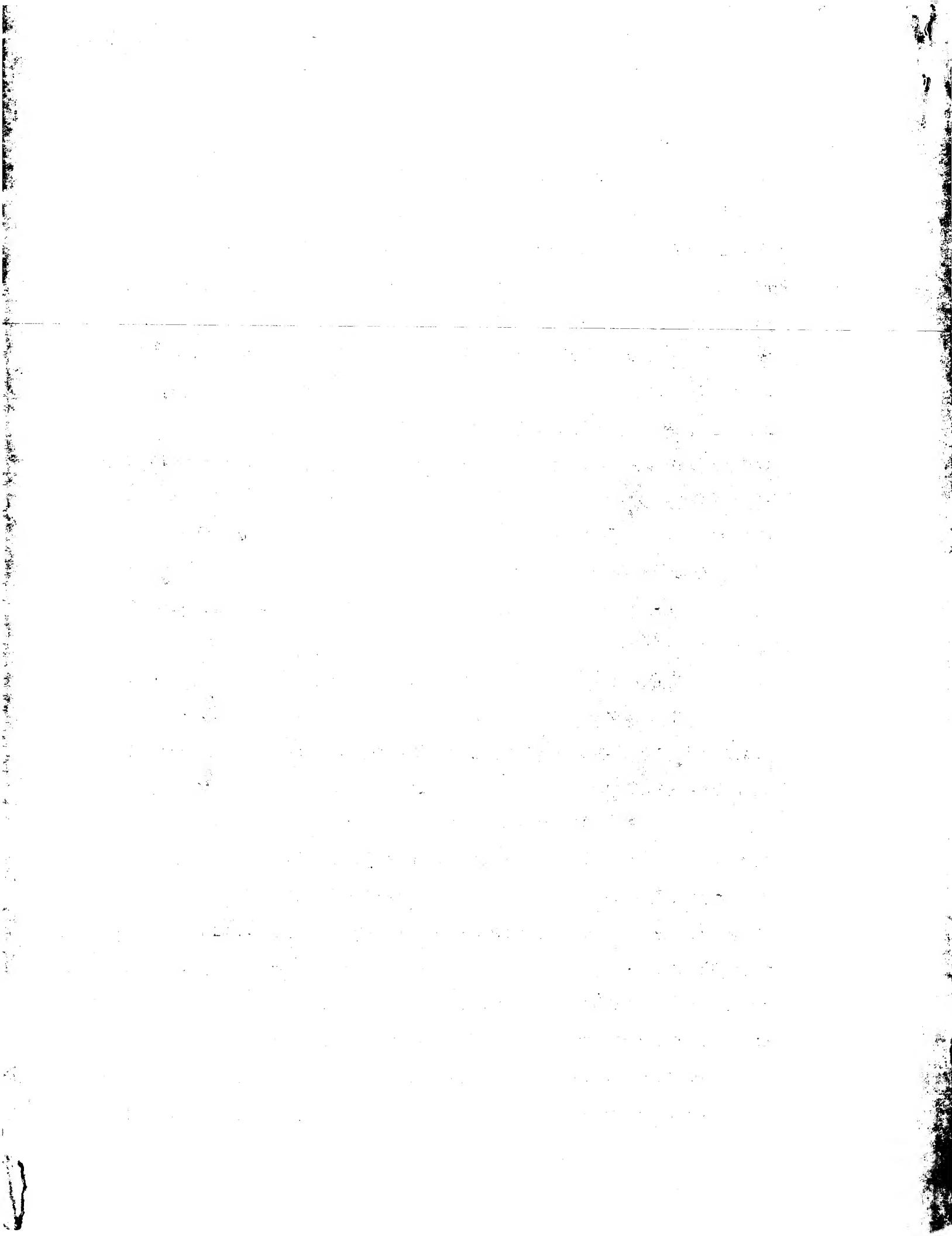
として寄託されているハイブリドーマNOK4が產生する抗体と同等で  
あり、(2)L鎖の超可変領域が配列表の配列番号13で表されるアミ  
ノ酸配列の①24番目のArgから38番目のHisまで、②54番目  
5 番目のArgから60番目のSerまで、及び③93番目のGlnから101  
番目のThrまであることを特徴とするモノクローナル抗体またはその  
活性フラグメント。

38. ヒトFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体ま  
たはその活性フラグメントであって、(1)そのアポトーシス抑制効果  
が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5048  
10 として寄託されているハイブリドーマNOK5が產生する抗体と同等で  
あり、(2)H鎖の超可変領域が配列表の配列番号15で表されるアミ  
ノ酸配列の①30番目のThrから34番目のHisまで、②49番目  
のTyrから65番目のAspまで、及び③93番目のTyrから106  
番目のTyrまであることを特徴とするモノクローナル抗体またはその  
15 活性フラグメント。

39. ヒトFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体ま  
たはその活性フラグメントであって、(1)そのアポトーシス抑制効果  
が工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5048  
20 として寄託されているハイブリドーマNOK5が產生する抗体と同等で  
あり、(2)L鎖の超可変領域が配列表の配列番号17で表されるアミ  
ノ酸配列の①24番目のLysから34番目のAlaまで、②50番目  
のTyrから56番目のThrまで、及び③89番目のGlnから97  
番目のThrまであることを特徴とするモノクローナル抗体またはその  
活性フラグメント。

25 40. 請求項30ないし39のいずれか1項に記載のモノクローナル  
抗体またはその活性フラグメントの変異体。

41. 請求項30ないし39のいずれか1項に記載のモノクローナル  
抗体またはその活性フラグメントのH鎖またはL鎖の超可変領域をコ-



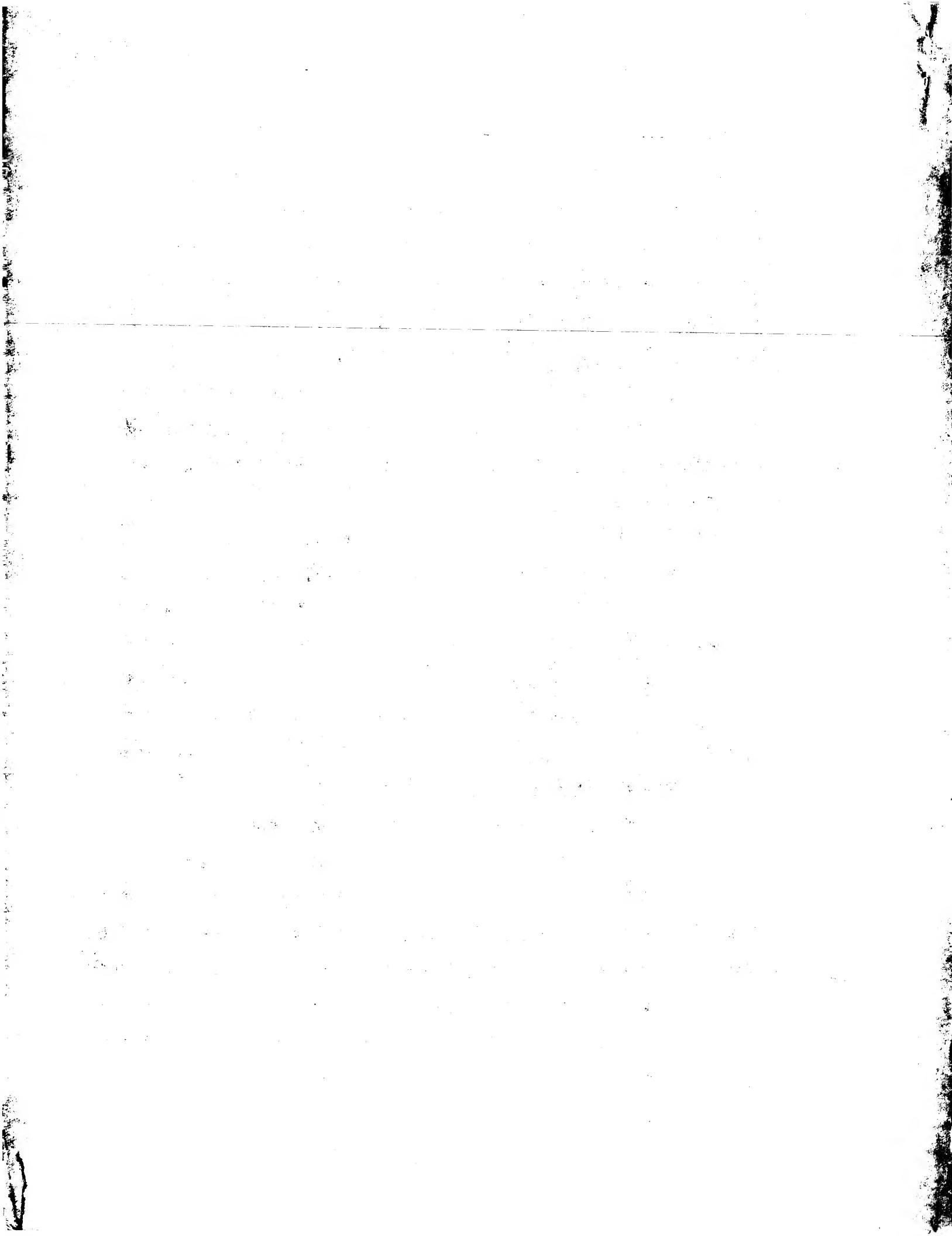
ドする部分を少なくとも含むDNAまたはRNA。

42. Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントであって、モノクローナル抗体が、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5044(ハイブリドーマNOK1)、  
5 FERM BP-5045(ハイブリドーマNOK2)、FERM BP-5046(ハイブリドーマNOK3)、FERM BP-5047(ハイブリドーマNOK4)、FERM BP-5048(ハイブリドーマNOK5)、及びFERM BP-5334(ハイブリドーマKAY-10)として寄託されているハイブリドーマ細胞株のいずれか1つから  
10 產生されるものであることを特徴とするモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

43. Fasリガンド発現細胞の培養上清中に存在する可溶性Fasリガンドをアフィニティー精製することができる請求項1、3、5、6、  
7、8、9及び12のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体または  
15 その活性フラグメント。

44. Fasリガンド発現細胞上のFasリガンド分子あるいは培養液中に分泌された可溶性Fasリガンド分子を免疫沈降することができる請求項1、3、5、6、7、8、9及び12のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体またはその活性フラグメント。

20 45. (1) 機能的なFas分子を発現していない動物(ヒトを除く)を、Fasリガンド分子またはFasリガンド発現細胞で免疫感作する、  
25 (2) この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する、(3) 該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する、(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する、(5) ハイブリドーマを含有する培養上清液に分泌されている抗体が、Fasリガンドを発現させたCOS細胞の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃



を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する、(6)所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養ウエル中の細胞群をクローニングする、(7)所望の抗体を分泌しているクローンを選択する、(8)再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローンを樹立する、(9)このハイブリドーマの培養上清液あるいは該ハイブリドーマをマウス腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する、各工程を含むことを特徴とするFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体の製造方法。

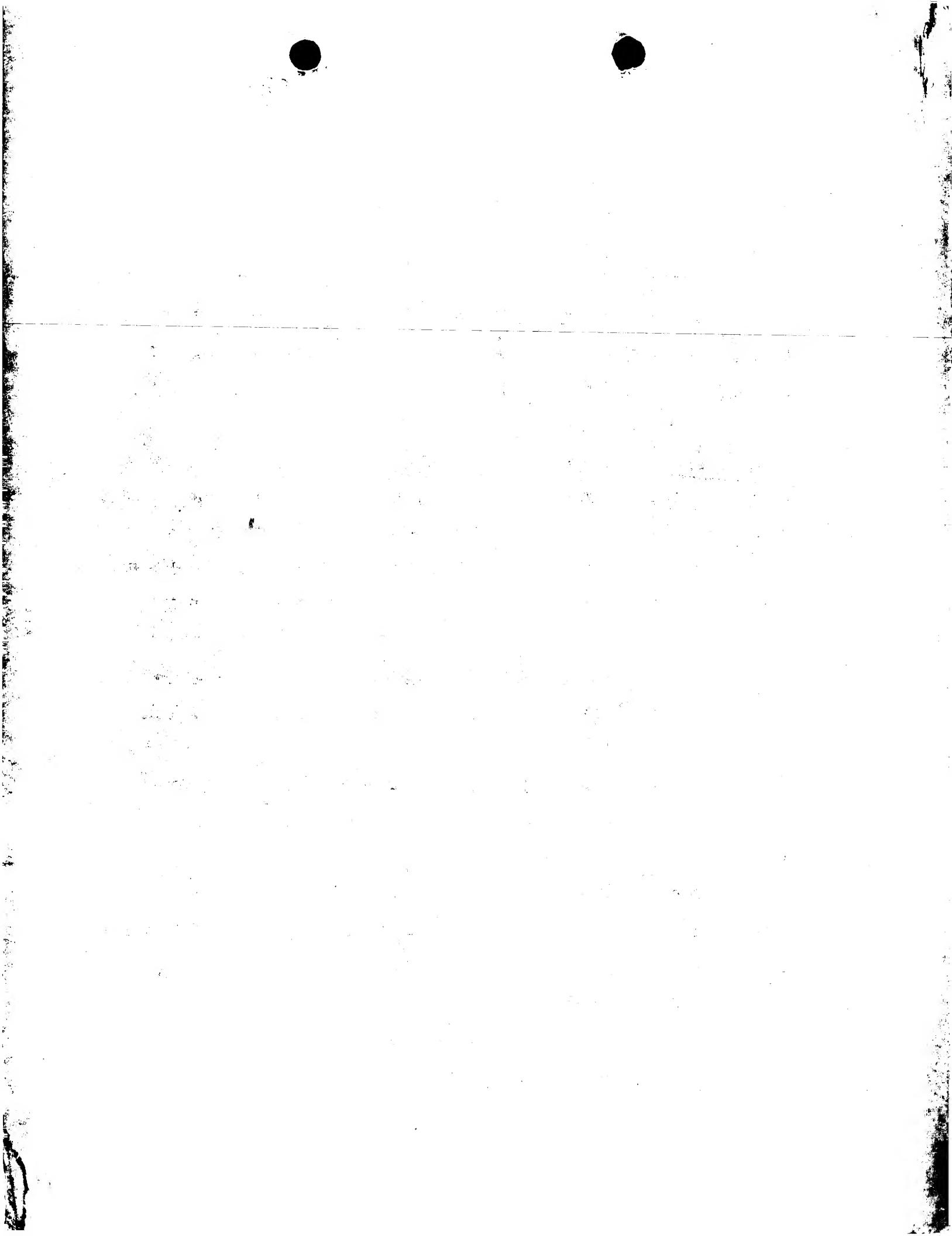
10 46. 請求項1ないし28、30ないし40、及び42ないし44のいずれか1項に記載のFasリガンドに対するモノクローナル抗体を複数組み合わせることにより、溶液中のFasリガンドを検出する方法。

47. 複数のモノクローナル抗体のうち、一種のモノクローナル抗体を担体に固定し、他種のモノクローナル抗体を標識化合物で標識し、そして、モノクローナル抗体を固定した担体をFasリガンドを含むと思われる検体の溶液と接触させて検体を吸着させ、吸着した検体を標識化合物で標識したモノクローナル抗体により検出する請求項46記載の検出方法。

48. IgMタイプの精製したモノクローナル抗体を担体に固定し、IgGタイプのビオチン標識したモノクローナル抗体により、溶液中のFasリガンドを検出する請求項47記載の検出方法。

49. 請求項1ないし28、30ないし40、及び42ないし44のいずれか1項に記載のFasリガンドに対するモノクローナル抗体を複数組み合わせてなるFasリガンド検出用キット。

50. 伝染性单核球症(IM)、全身性エリテマトーデス(SLE)、または肝炎(Hepatitis)に罹患したヒトの血液中のFasリガンドの濃度を検出する請求項49記載のキット。



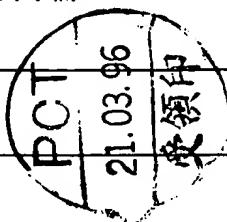
特許協力条約に基づく国際出願

願書

28 Rock

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

受理庁記入欄	
国際出願番号	
国際出願日	
(受付印) 19 SEP 1997	
出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合は最大12字) SD-239	



第I欄 発明の名称

Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体及びその製造方法

第II欄 出願人

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

住友電気工業株式会社

SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.

〒541 日本国大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

5-33, Kitahama 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,  
Osaka 541 Japan

この欄に記載した者は、  
発明者である。

電話番号:  
045-  
853-7101

ファクシミリ番号:  
045-  
851-9134

加入電信番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:  すべての指定国  米国を除くすべての指定国  米国のみ  追記欄に記載した指定国

第III欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

榎垣 伸彦 KAYAGAKI Nobuhiko

〒113 日本国東京都文京区本郷2-1-1

順天堂大学医学部免疫学教室

c/o Department of Immunology, Juntendo University,  
School of Medicine, 2-1-1, Hongo, Bunkyo-ku,  
Tokyo 113 Japan

この欄に記載した者は  
次に該当する:

出願人である。

出願人及び発明者である。

発明者である。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である:  すべての指定国  米国を除くすべての指定国  米国のみ  追記欄に記載した指定国

その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。

第IV欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のため行動する:

代理人

共通の代表者

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

9352 弁理士 西川 繁明 NISHIKAWA Shigeaki

〒116 日本国東京都荒川区東日暮里三丁目43番8号

ビジュアル・シティ401号

Visual City 401, 43-8, Higashi-Nippori 3-chome,  
Arakawa-ku, Tokyo 116 Japan

電話番号:  
03-  
3891-5901

ファクシミリ番号:  
03-  
3891-5394

加入電信番号:

代理人又は共通の代表者が選任されていないときに、通知が送付されるあて名を記載する場合はレ印を付す



## 第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を顎書に添付する必要はない。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

八木田秀雄 YAGITA Hideo

〒113 日本国東京都文京区本郷2-1-1

順天堂大学医学部免疫学教室内

c/o Department of Immunology, Juntendo University,

School of Medicine, 2-1-1, Hongo, Bunkyo-ku,

Tokyo 113 Japan

この欄に記載した者は  
次に該当する： 出願人である。 出願人及び発明者である。 発明者である。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である：  すべての指定国  米国を除くすべての指定国  米国のみ  追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

奥村康 OKUMURA Ko

〒113 日本国東京都文京区本郷2-1-1

順天堂大学医学部免疫学教室内

c/o Department of Immunology, Juntendo University,

School of Medicine, 2-1-1, Hongo, Bunkyo-ku,

Tokyo 113 Japan

この欄に記載した者は  
次に該当する： 出願人である。 出願人及び発明者である。 発明者である。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である：  すべての指定国  米国を除くすべての指定国  米国のみ  追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

中田元巳 NAKATA Motomi

〒244 日本国神奈川県横浜市栄区田谷町1番地

住友電気工業株式会社横浜製作所内

c/o Yokohama Works of Sumitomo Electric Industries, Ltd.,

1, Taya-cho, Sakae-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 244

Japan

この欄に記載した者は  
次に該当する： 出願人である。 出願人及び発明者である。 発明者である。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）： 日本国 JAPAN

住所（国名）： 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である：  すべての指定国  米国を除くすべての指定国  米国のみ  追記欄に記載した指定国

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

この欄に記載した者は  
次に該当する： 出願人である。 出願人及び発明者である。 発明者である。  
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍（国名）：

住所（国名）：

この欄に記載した者は、次の  
指定国についての出願人である：  すべての指定国  米国を除くすべての指定国  米国のみ  追記欄に記載した指定国 その他の出願人又は発明者が続葉に記載されている。



### 第V欄　国の指定

規則4.9(a)の規定に基づき次の国を指定する(該当する□内にレ印を付すこと、及び少なくとも1国を指定すること)。

## 広域特許

A P A R I P O 特許 : K E ケニア Kenya, M W マラウイ Malawi, S D スーダン Sudan, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国

E P ヨーロッパ特許 : A T オーストリア Austria, B E ベルギー Belgium, C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, D E ドイツ Germany, D K デンマーク Denmark, E S スペイン Spain, F R フランス France, G B 英国 United Kingdom, G R ギリシャ Greece, I E アイルランド Ireland, I T イタリア Italy, L U ルクセンブルグ Luxembourg, M C モナコ Monaco, N L オランダ Netherlands, P T ポルトガル Portugal, S E スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国

O A O A P I 特許 : B F ブルキナ・ファソ Burkina Faso, B J ベナン Benin, C F 中央アフリカ Central African Republic, C G コンゴー Congo, C I 象牙海岸 Côte d'Ivoire, C M カメルーン Cameroon, G A ガボン Gabon, G N ギニア Guinea, M L マリ Mali, M R モーリタニア Mauritania, N E ニジェール Niger, S N セネガル Senegal, T D チャド Chad, T G トーゴ Togo, 及びアフリカ知的  
所有権機関と特許協力条約の締約国である他の国 (他のO A P I 保護を求める場合には点線上に記載する)

国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線上に記載する)

<input type="checkbox"/> A M アルメニア Armenia	<input type="checkbox"/> M G マダガスカル Madagascar
<input type="checkbox"/> A T オーストリア Austria	<input type="checkbox"/> M N モンゴル Mongolia
<input checked="" type="checkbox"/> A U オーストラリア Australia	<input type="checkbox"/> M W マラウイ Malawi
<input type="checkbox"/> B B バルバドス Barbados	<input type="checkbox"/> N L オランダ Netherlands
<input type="checkbox"/> B G ブルガリア Bulgaria	<input type="checkbox"/> N O ノールウェー Norway
<input type="checkbox"/> B R ブラジル Brazil	<input type="checkbox"/> N Z ニュー・ジーランド New Zealand
<input type="checkbox"/> B Y ベラルーシ Belarus	<input type="checkbox"/> P L ポーランド Poland
<input checked="" type="checkbox"/> C A カナダ Canada	<input type="checkbox"/> P T ポルトガル Portugal
<input type="checkbox"/> C H and L I スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein	<input type="checkbox"/> R O ルーマニア Romania
<input type="checkbox"/> C N 中国 China	<input checked="" type="checkbox"/> R U ロシア連邦 Russian Federation
<input type="checkbox"/> C Z チェコ Czech Republic	<input type="checkbox"/> S D スーダン Sudan
<input type="checkbox"/> D E ドイツ Germany	<input type="checkbox"/> S E スウェーデン Sweden
<input type="checkbox"/> D K デンマーク Denmark	<input type="checkbox"/> S I スロベニア Slovenia
<input type="checkbox"/> E S スペイン Spain	<input type="checkbox"/> S K スロヴァキア Slovakia
<input type="checkbox"/> F I フィンランド Finland	<input type="checkbox"/> T J タジキスタン Tajikistan
<input type="checkbox"/> G B 英国 United Kingdom	<input type="checkbox"/> T T トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago
<input type="checkbox"/> G E グルジア Georgia	<input type="checkbox"/> U A ウクライナ Ukraine
<input type="checkbox"/> H U ハンガリー Hungary	<input checked="" type="checkbox"/> U S 米国 United States of America
<input checked="" type="checkbox"/> J P 日本 Japan	<input type="checkbox"/> U Z ウズベキスタン Uzbekistan
<input type="checkbox"/> K E ケニア Kenya	<input type="checkbox"/> V N ヴィエトナム Viet Nam
<input type="checkbox"/> K G キルギスタン Kyrgyzstan	
<input type="checkbox"/> K R 韓国 Republic of Korea	
<input type="checkbox"/> K Z カザフスタン Kazakhstan	
<input type="checkbox"/> L K スリ・ランカ Sri Lanka	
<input type="checkbox"/> L T リトアニア Lithuania	
<input type="checkbox"/> L U ルクセンブルグ Luxembourg	
<input type="checkbox"/> L V ラトヴィア Latvia	
<input type="checkbox"/> M D モルドバ Republic Moldova	

下の欄は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定  
(国内特許のために) するためのものである

.....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....  
 .....

下の欄は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定（国内特許のために）するためのものである

出願人は、上記の指定に加えて、

の指定を除き、特許協力条約の規定

により認められたすべての締約国を規則 4.9(b)の規定に基づき指定する。

出願人は、かかる指定が優先日から 15 月が経過する前に確認されない指定はこの期間が経過するときに出願人によって取り下げられたものとする旨を宣誓する(指定の確認は、指定を特定する通知並びに指定手数料及び確認手数料の納付から構成される。確認は、優先日から 15 月以内に受理官庁に提出されなければならない)。



## 第VI欄 優先権主張

他の優先権の主張が追記欄に記載されている 

下記の先の出願に基づく優先権を主張する

国名 (その国において又はその 国について出願がされた)	先の出願の日 (日・月・年)	先の出願の番号	先の出願がされた官庁名 (広域出願又は国際出願のみ)
(1) 日本国 Japan	20. 03. 95	平成7年特許願 第 87420号	
(2) 日本国 Japan	27. 10. 95	平成7年特許願 第303492号	
(3)			

先の出願が、本件国際出願について受理官庁である国内官庁に対して行われたときは、出願人は、手数料の納付を条件に以下を請求する。

 上記の先の出願のうち次の番号の出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを特許庁長官に請求している。

## 第VII欄 國際調査機関

## 國際調査機関 (ISA) の選択

ISA / JP

先の調査 國際調査機関による調査(国際・国際型又はその他)を既に請求しており、可能な限り当該調査の結果を国際調査の基礎とすることを請求する場合に記入する。関連する出願(若しくはその翻訳)又は関連する調査請求を表示することにより当該調査又は請求を特定する:

国名(又は広域官庁)

出願日(日・月・年)

番号

## 第VIII欄 照合欄

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

1. 願書	4 枚
2. 明細書	101 枚
3. 請求の範囲	12 枚
4. 要約書	1 枚
5. 図面	14 枚
合計	132 枚

出願時におけるこの国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

1. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状	5. <input checked="" type="checkbox"/> 所定の手数料の納付
2. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し	<input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
3. <input type="checkbox"/> 記名押印(署名)の説明書	<input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
4. <input type="checkbox"/> 上記第VI欄に記載された優先権 書類(具体的に記載する):	6. <input checked="" type="checkbox"/> 寄託した微生物に関する書面
	7. <input type="checkbox"/> ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リスト (フレキシブルディスク)
	8. <input type="checkbox"/> その他(具体的に記載する)

要約書とともに公表する図として 第 \_\_\_\_\_ 図 を提示する(図面がある場合)

## 第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名を記載し、その次に押印する。願書により資格が明白に表示されてない場合その者が押印している資格を表示する。

西川繁明

受理官庁記入欄		2. 図面
1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日		
3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって その後期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)		
4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日		
5. 出願人により特定された 国際調査機関	I S A / J P	
6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払につき、国際調査機関に 調査用写しを送付していない		

<input type="checkbox"/> 受理された
<input type="checkbox"/> 不足図面がある

## 国際事務局記入欄

記録原本の受理の日





〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則7. 1に従い  
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

氏名（名称） 住友電気工業株式会社  
代表取締役 倉内 憲孝

寄託者

あて名 ㊞ 541  
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

殿

I. 微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）  
NOK1

（受託番号）  
FERM BP- 5044

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 7年 3月 20日（原寄託日）に受領したI欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）にI欄の微生物を受領した。  
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

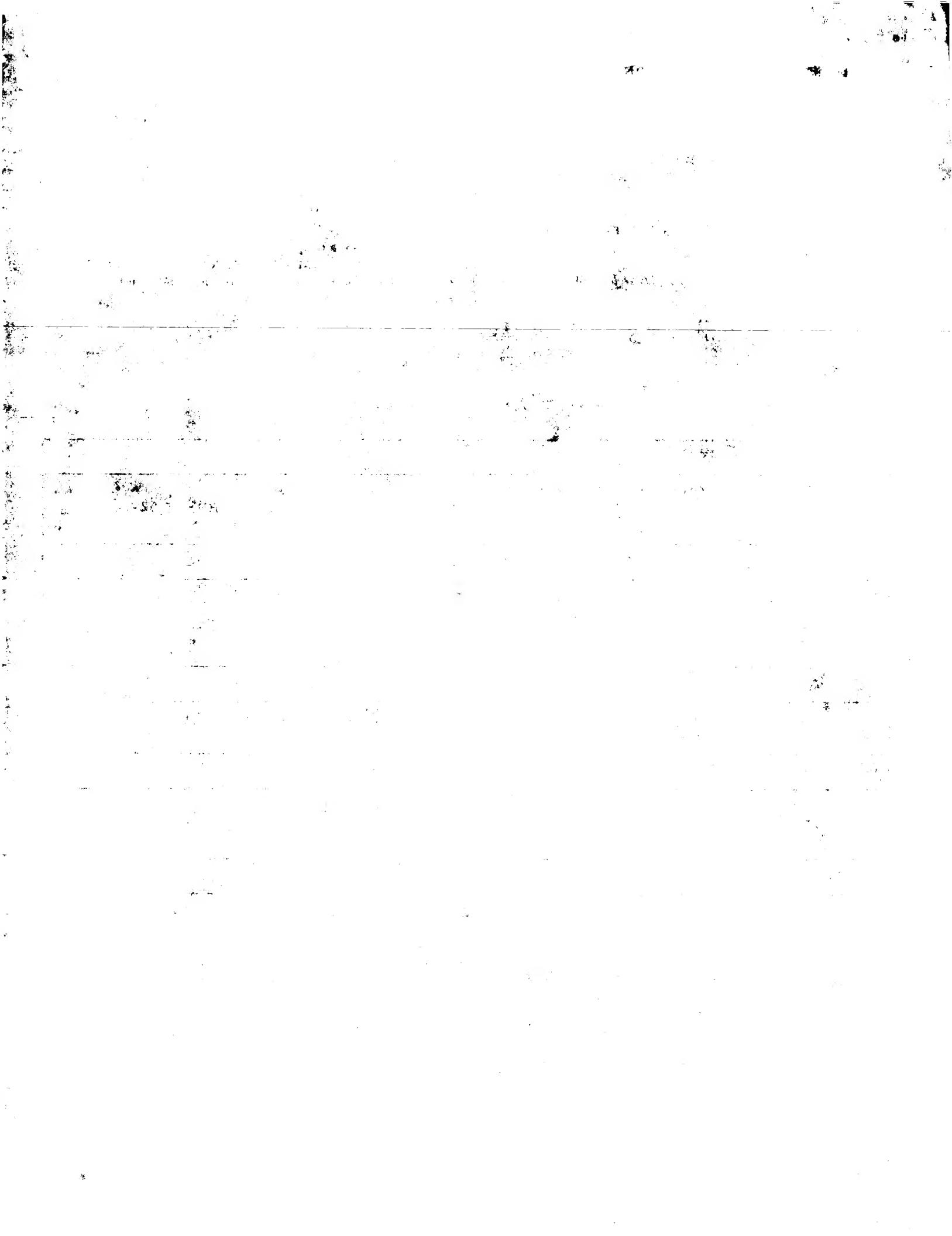
V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Natural Science and Technology

所長 鈴木 修  
Osamu Suzuki  
DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN





BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則7. 1に従い  
発行される

原寄託についての受託証

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

氏名（名称） 住友電気工業株式会社  
代表取締役 倉内 憲孝

寄託者

あて名 ㊞ 541  
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

殿

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)  
NOK 2

(受託番号)  
FERM BP- 5045

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 7年 3月 20日（原寄託日）に受領したI欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）にI欄の微生物を受領した。  
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

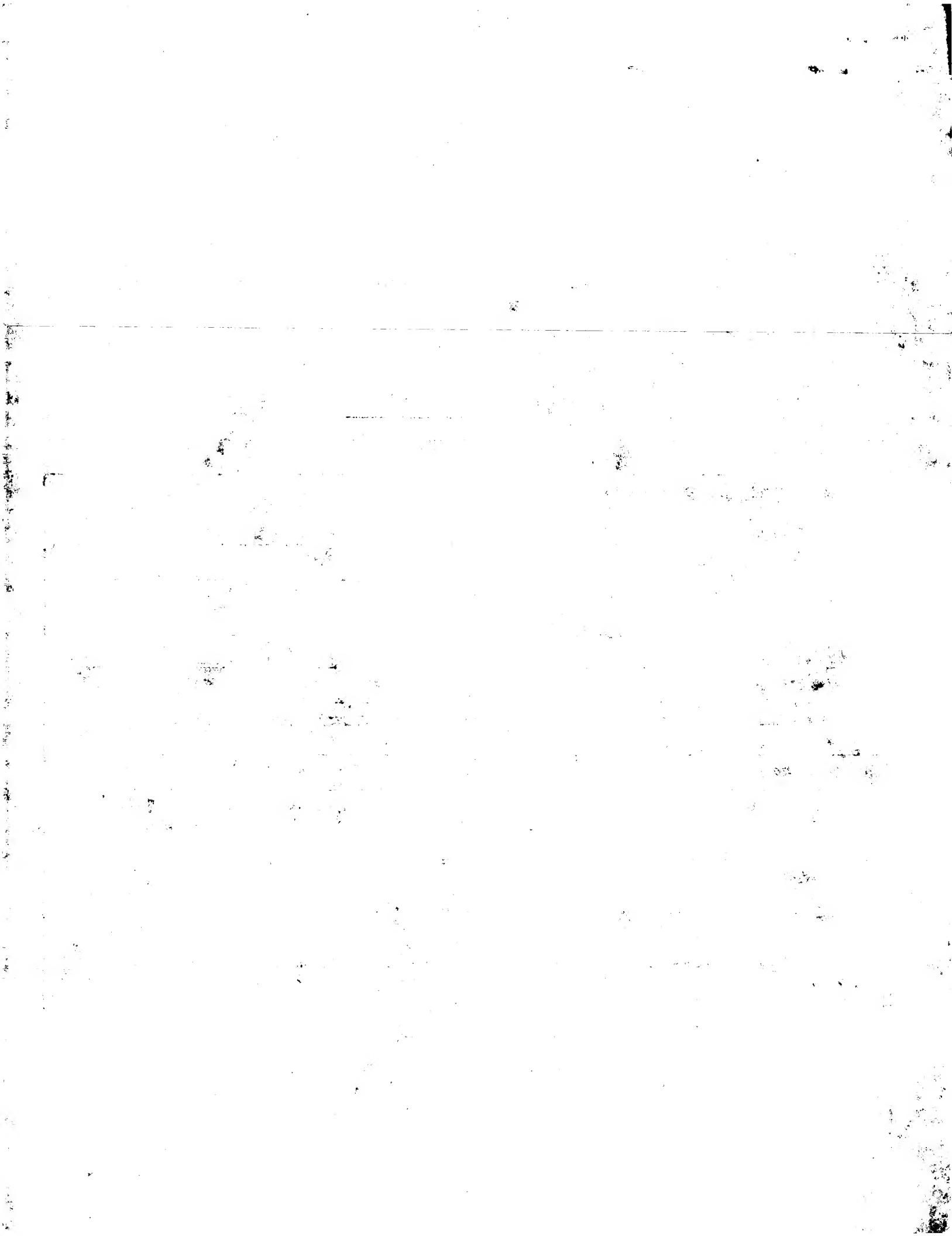
V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology  
独立行政法人  
独立行政法人  
独立行政法人

所長 鈴木 修  
Osamu Suzuki, Director General

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN



## BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約〕下記国際寄託当局によって規則7. 1に従い  
発行される

## 原寄託についての受託証

## RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

氏名（名称） 住友電気工業株式会社  
寄託者 代表取締役 倉内 憲孝  
あて名 ㊞ 541 殿  
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

## I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)  
NOK 3(受託番号)  
FERM BP- 5046

## II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

## III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 7年 3月 20日（原寄託日）に受領したI欄の微生物を受託する。

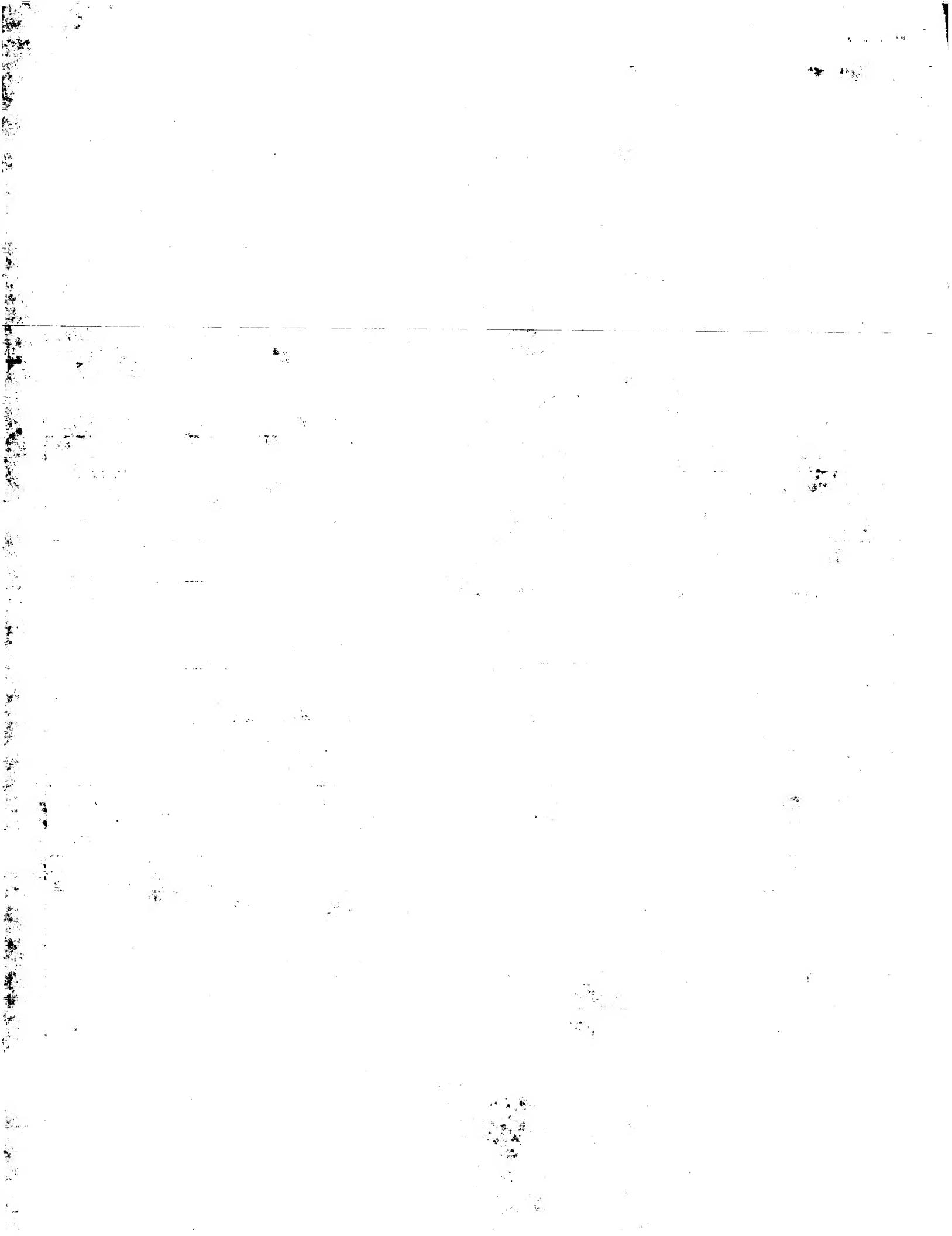
## IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）にI欄の微生物を受領した。  
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

## V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology所長 鈴木 修  
Osamu Suzuki, Dr. DIRECTOR GENERAL.あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN





BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される

原寄託についての受託証

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY identified at the bottom of this page.

氏名（名称） 住友電気工業株式会社  
代表取締役 倉内 恵孝

寄託者

殿

あて名 〒 541  
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

I. 微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）  
NOK4

（受託番号）  
FERM BP- 5047

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 7 年 3 月 20 日（原寄託日）に受領した I 欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に I 欄の微生物を受領した。  
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

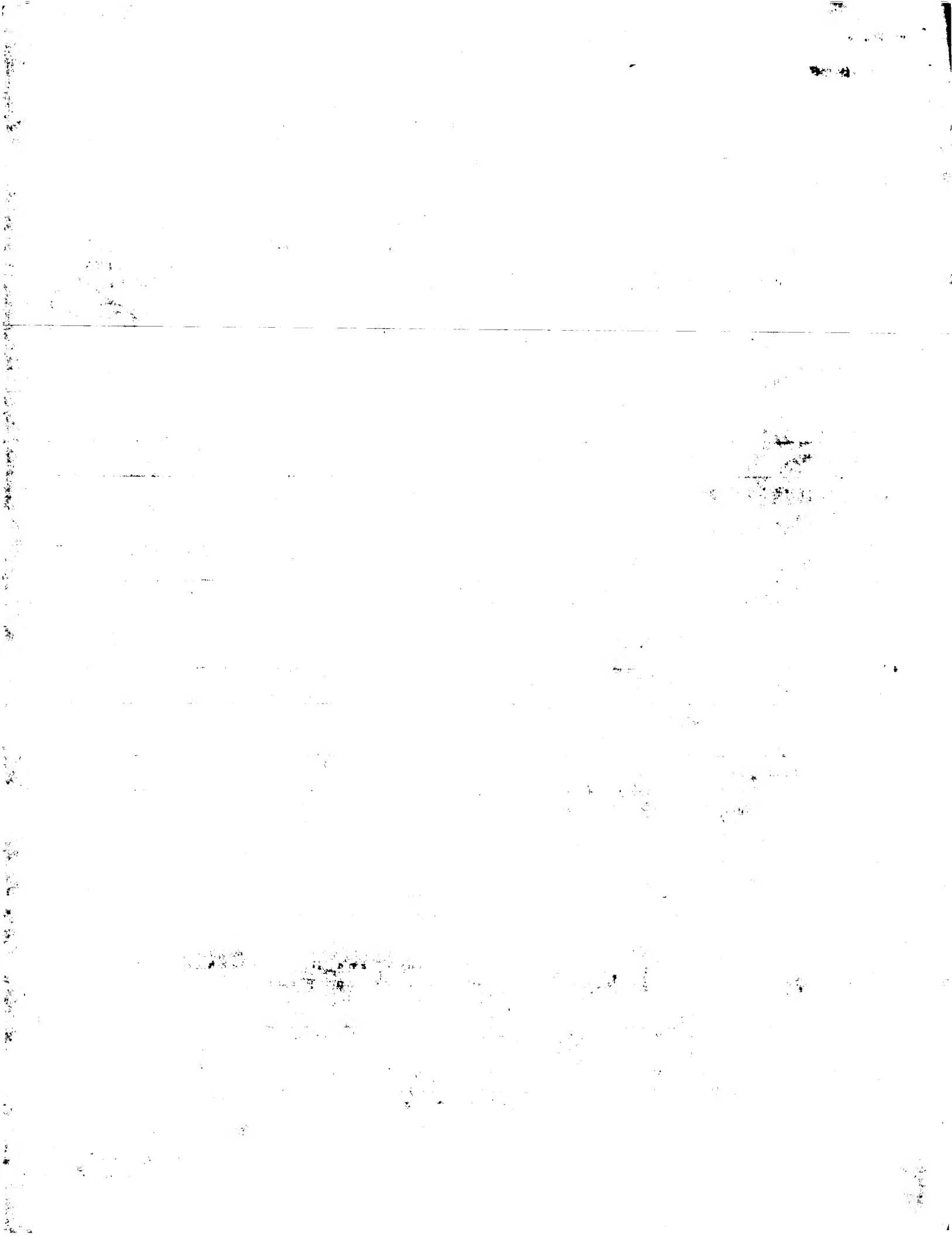
V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

所 長 鈴木 修  
Osamu Suzuki, Dr., DIRECTOR GENERAL.

あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN





〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い  
発行される

原寄託についての受託証

氏名（名称） 住友電気工業株式会社  
寄託者 代表取締役 倉内 恵孝  
あて名 ㊞ 541 殿  
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7. 1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示) NOK 5	(受託番号) FERM BP- 5048
----------------------------	-------------------------

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 7 年 3 月 20 日（原寄託日）に受領した I 欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に I 欄の微生物を受領した。  
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

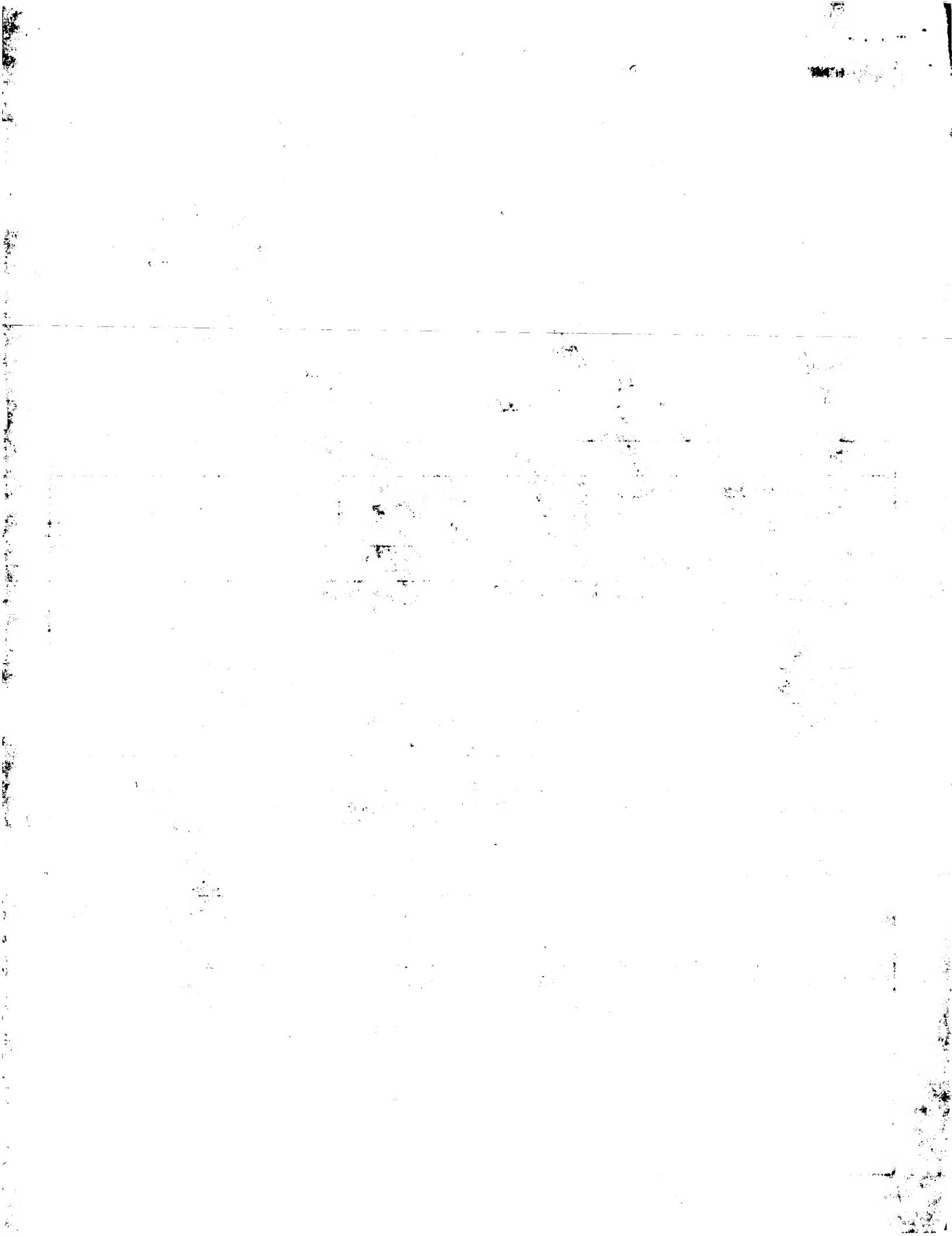
V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

所 長 鈴木 修  
Osamu Suzuki, Dr., DIRECTOR GENERAL.

あて名： 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（郵便番号 305 ）  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN





〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認  
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則7. 1に従い  
発行される

原寄託についての受託証

氏名（名称） 住友電気工業株式会社  
代表取締役 倉内 恵孝

寄託者

あて名 〒 541  
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

殿

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF  
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF  
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL  
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
identified at the bottom of this  
page.

I. 微生物の表示

（寄託者が付した識別のための表示）  
KAY-10

（受託番号）  
FERM BP- 5334

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

科学的性質  
 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 7年 12月 14日（原寄託日）に受領したI欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に I 欄の微生物を受領した。  
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

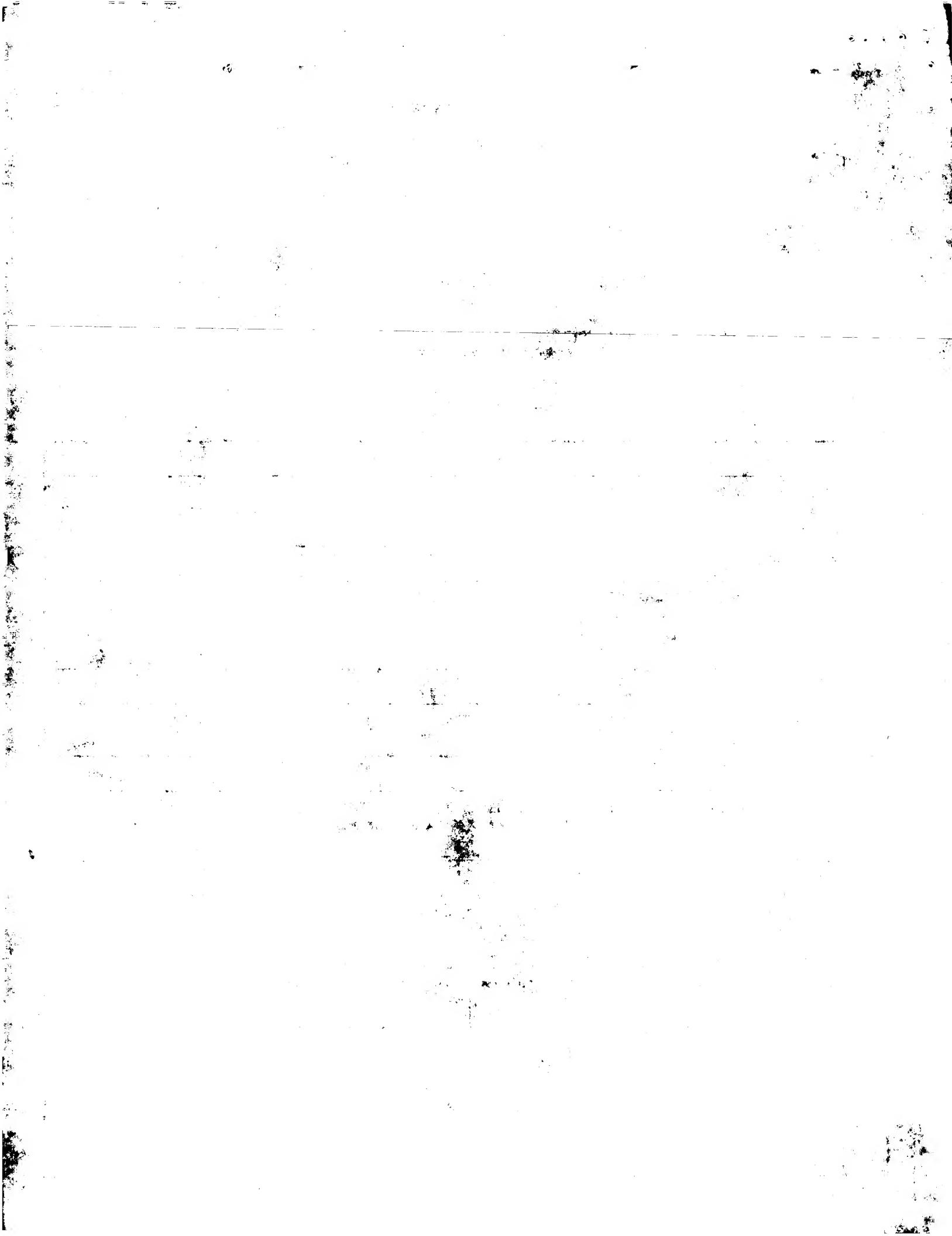
V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称： National Institute of Science and Human-Technology  
Agency of Industrial Science and Technology

所長 大石道夫  
Michio Oishi D. , DIRECTOR GENERAL.

あて名： 日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号（郵便番号305）  
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken  
305, JAPAN



19 Sept 97

CLAIMS

1. A monoclonal antibody which specifically reacts with a Fas ligand, or an active fragment thereof.
5. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, wherein a species of the Fas ligand is the human.
10. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, wherein a species of the Fas ligand is a mouse.
15. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 3, which does not react with a mouse-derived Fas ligand classified in the same type as the type of MHC class II of a mouse immunosensitized with a Fas ligand for the purpose of providing said antibody.
20. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is a mouse-derived monoclonal antibody.
25. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is a monoclonal antibody produced by any one of hybridoma cell lines deposited as Accession Nos. FERM BP-5044 (Hybridoma NOK1), FERM BP-5045 (Hybridoma NOK2), FERM BP-5046 (Hybridoma NOK3), FERM BP-5047 (Hybridoma NOK4), FERM BP-5048 (Hybridoma NOK5) and FERM BP-5334 (Hybridoma KAY-10) in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology.



7. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which can recognize a Fas ligand present on a human cell surface or a soluble Fas ligand and also a Fas ligand present on a monkey cell surface.

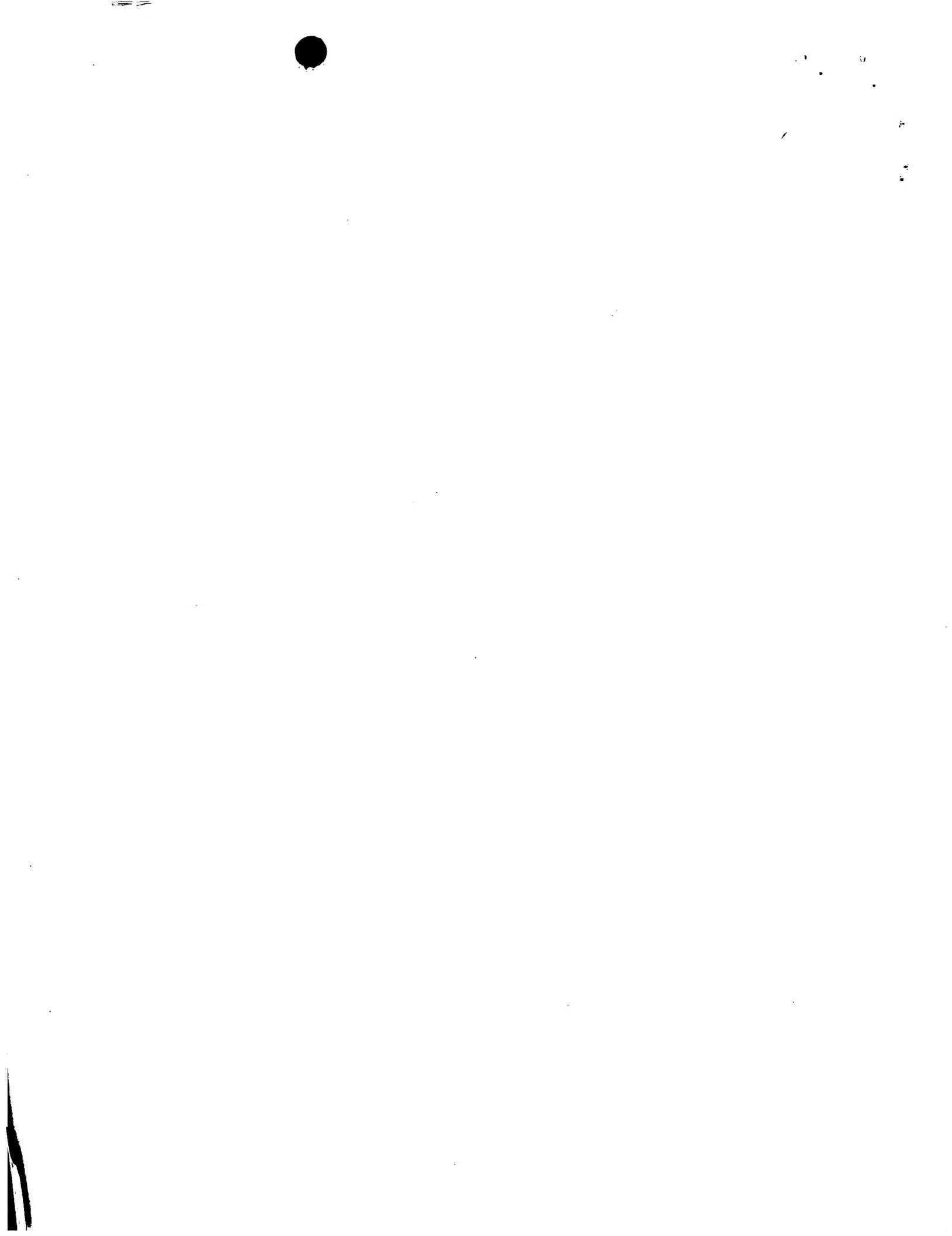
8. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which reacts with an amino acid sequence region set forth in SEQ ID NO:31 of SEQUENCE LISTING in the Fas ligand.

9. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which can more strongly react with a Fas ligand than a physiological reaction between the Fas ligand and Fas.

10. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which can inhibit a physiological reaction between the Fas ligand and Fas.

11. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, wherein the inhibition of the physiological reaction between the Fas ligand and Fas is the inhibition of apoptosis of Fas-expressed cells induced by a soluble Fas ligand secreted by the Fas ligand-expressed cells, or a Fas ligand present on a Fas-expressed cell surface.

12. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 11, which can inhibit the apoptosis of Fas-expressed cells induced by the soluble Fas ligand at an apoptosis inhibition rate of at least 90%.



wherein the apoptosis inhibition rate means a survival rate of target cells, to which an antibody has been added, in a cytotoxic reaction test in which a soluble Fas ligand contained in a 12-fold dilution of a culture supernatant of Fas ligand gene-transfected cells is used as an effector molecule, and on the other hand, Fas gene-transfected cells are used as target cells, and both are reacted in a reaction system of 100  $\mu$ l in a 96-well plate to determine the survival rate of the target cells after 16 hours using a reagent for detecting viable cell numbers.

13. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 12, wherein the survival rate (i.e., apoptosis inhibition rate) of the target cells can be enhanced to at least 90% when the monoclonal antibody is a monoclonal antibody produced by any one of the hybridomas NOK1 to NOK5, the soluble Fas ligand contained in the 12-fold dilution of the culture supernatant of the Fas ligand gene-transfected cells is used as the effector molecule in an amount of 25  $\mu$ l in terms of such a dilution, the Fas gene-transfected cells (Fas/WR19L) are used as the target cells in an amount of 50  $\mu$ l in terms of its solution at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/ml, and a culture supernatant of the hybridoma containing said monoclonal antibody is used in an amount of 25  $\mu$ l to mix all these components with one another, thereby conducting a reaction at 37°C for 16 hours.

14. The monoclonal antibody or the active fragment



thereof according to Claim 11, wherein the inhibitory activity against apoptosis is higher than that of a Fas-Ig chimera molecule.

15. The monoclonal antibody or the active fragment  
5 thereof according to Claim 14, which exhibits higher inhibitory activity against apoptosis at a concentration (effective concentration) of 0.01-8  $\mu$ g/ml than the Fas-Ig chimera molecule at the same concentration.

16. The monoclonal antibody or the active fragment  
10 thereof according to Claim 10, wherein with respect to the inhibition of the physiological reaction between the Fas ligand and Fas, the antibody can inhibit a physiological reaction of a human Fas ligand, but not inhibit a physiological reaction of a mouse Fas ligand.

15 17. The monoclonal antibody or the active fragment  
thereof according to Claim 1, which can affinity-purify a soluble Fas ligand present in a culture supernatant of Fas ligand-expressed cells.

18. The monoclonal antibody or the active fragment  
20 thereof according to Claim 1, which can immunoprecipitate Fas ligand molecules on Fas ligand-expressed cell surfaces or soluble Fas ligand molecules secreted in a culture solution.

19. The monoclonal antibody or the active fragment  
25 thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an



antibody produced by Hybridoma NOK1 deposited as Accession No. FERM BP-5044 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the hypervariable regions of the H chain extending ① from Ser of the 30th to Asn of the 34th, ② from Arg of the 49th to Gly of the 65th and ③ from Tyr of the 93th or Ser of the 98th to Tyr of the 109th of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:1 of SEQUENCE LISTING.

20. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK1 deposited as Accession No. FERM BP-5044 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the hypervariable regions of the L chain extending ① from Arg of the 24th to Asn of the 34th, ② from Tyr of the 50th to Ser of the 56th and ③ from Gln of the 89th to Thr of the 97th of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:3 of SEQUENCE LISTING.

21. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK2 deposited as Accession No. FERM BP-5045 in National Institute of Bioscience and



Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the hypervariable regions of the H chain extending ① from Asn of the 30th to Gly of the 34th, ② from Tyr of the 49th to Gly of the 65th and ③ from Tyr 5 of the 93th or Tyr of the 98th to Tyr of the 107th of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:5 of SEQUENCE LISTING.

22. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against 10 human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK2 deposited as Accession No. FERM BP-5045 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and 15 Technology; and (2) the hypervariable regions of the L chain extending ① from Lys of the 24th to Gly of the 39th, ② from Leu of the 55th to Ser of the 61th and ③ from Phe of the 94th or Gln of the 95th to Thr of the 102th of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:7 of SEQUENCE 20 LISTING.

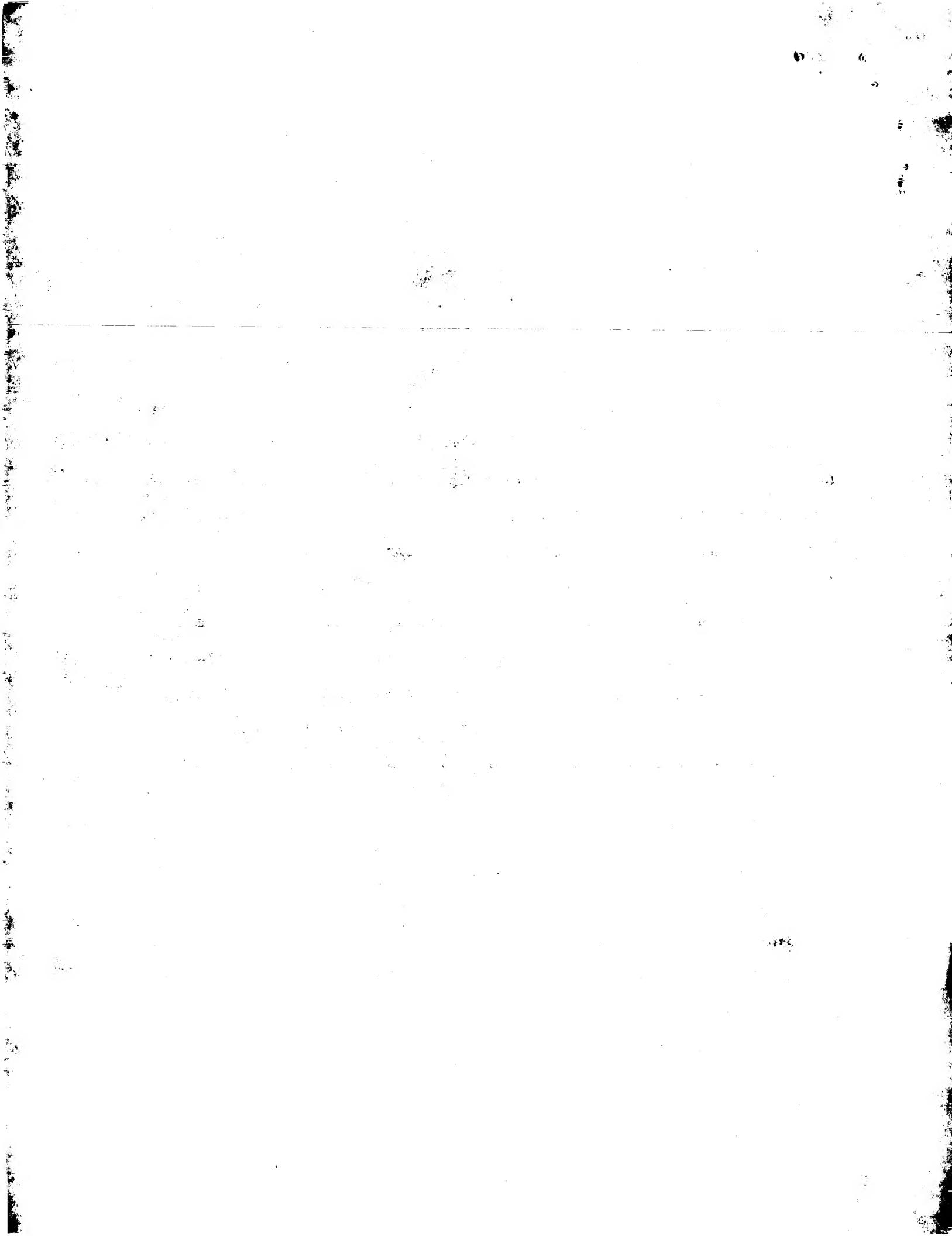
23. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an 25 antibody produced by Hybridoma NOK3 deposited as Accession No. FERM BP-5046 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and



Technology; and (2) the hypervariable regions of the H chain extending ① from Ser of the 30th to Asn of the 34th, ② from Arg of the 49th to Gly of the 65th and ③ from Tyr of the 93th or Asp of the 98th to Val of the 105th of the 5 amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:9 of SEQUENCE LISTING.

24. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the 10 inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK3 deposited as Accession No. FERM BP-5046 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the hypervariable regions of the L 15 chain extending ① from Lys of the 24th to Ser of the 34th, ② from Gly of the 50th to Thr of the 56th and ③ from Val of the 89th or Gln of the 90th to Thr of the 97th of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:29 of SEQUENCE LISTING.

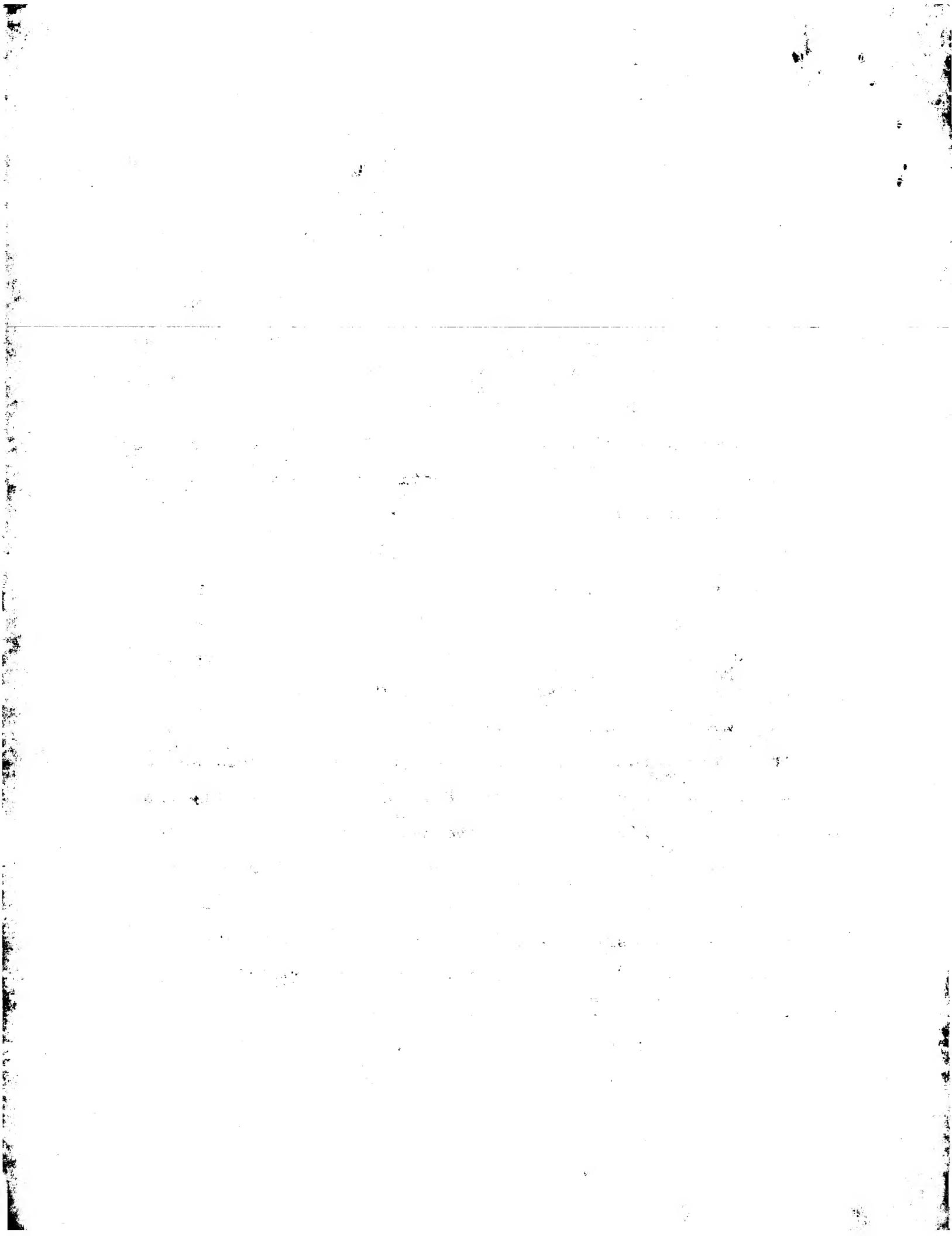
20 25. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK4 deposited as Accession 25 No. FERM BP-5047 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the hypervariable regions of the H



chain extending ① from Tyr of the 32th to Asn of the 35th, ② from Tyr of the 50th to Asn of the 65th and ③ from Tyr of the 93th to Tyr of the 107th of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11 of SEQUENCE LISTING.

5        26. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK4 deposited as Accession 10 No. FERM BP-5047 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the hypervariable regions of the L chain extending ① from Arg of the 24th to His of the 38th, ② from Arg of the 54th to Ser of the 60th and ③ from Gln 15 of the 93th to Thr of the 101th of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:13 of SEQUENCE LISTING.

20        27. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK5 deposited as Accession No. FERM BP-5048 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the hypervariable regions of the H 25 chain extending ① from Thr of the 30th to His of the 34th, ② from Tyr of the 49th to Asp of the 65th and ③ from Tyr of the 93th to Tyr of the 106th of the amino acid sequence



set forth in SEQ ID NO:15 of SEQUENCE LISTING.

28. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the 5 inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK5 deposited as Accession No. FERM BP-5048 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the hypervariable regions of the L 10 chain extending ① from Lys of the 24th to Ala of the 34th, ② from Tyr of the 50th to Thr of the 56th and ③ from Gln of the 89th to Thr of the 97th of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:17 of SEQUENCE LISTING.

29. DNAs or RNAs comprising at least a portion 15 encoding the hyper variable region of the H chain or L chain in the monoclonal antibody or the active fragment thereof according to any one of Claims 19 to 28.

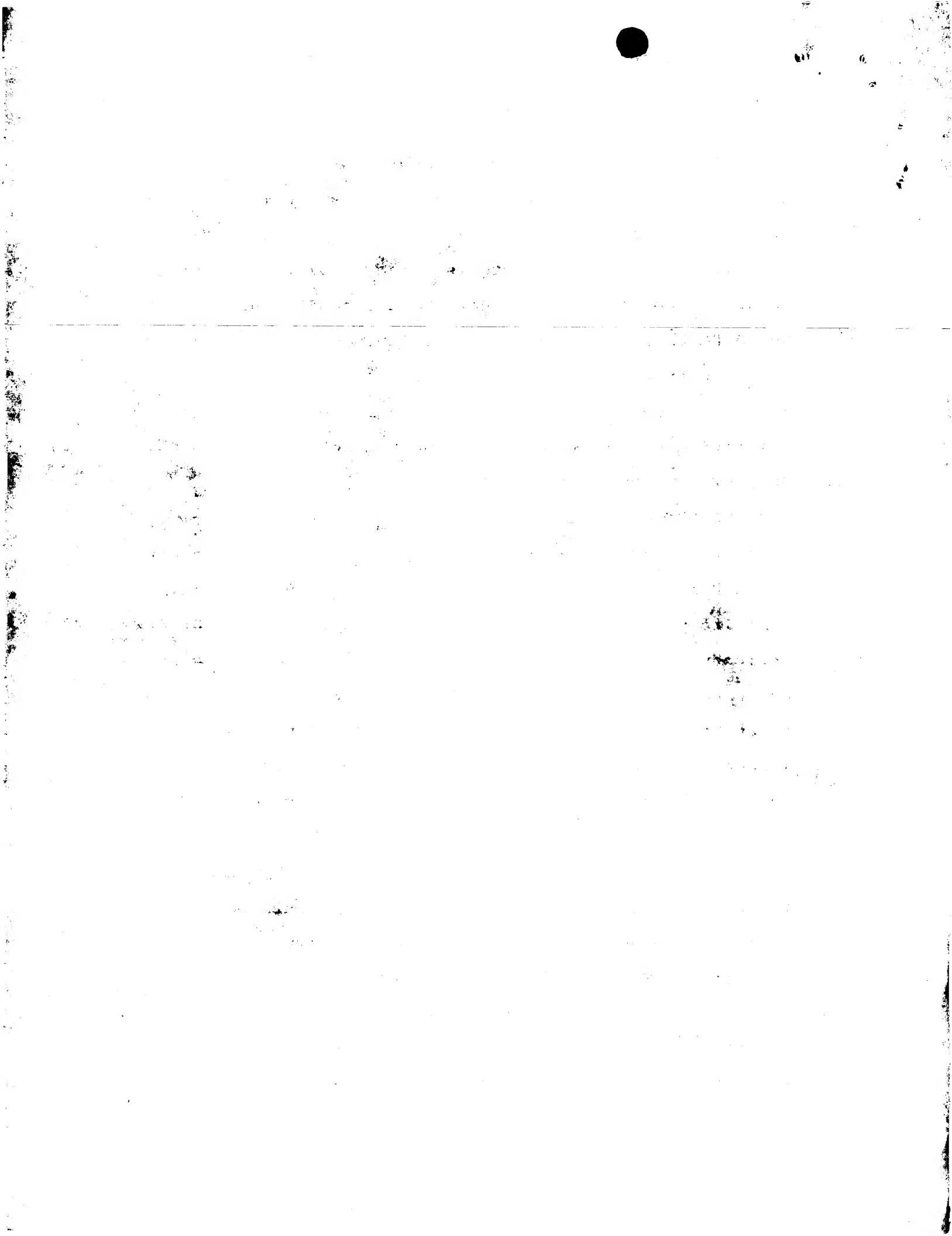
30. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against 20 human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK1 deposited as Accession No. FERM BP-5044 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and 25 Technology; and (2) the variable region of the H chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:1 of SEQUENCE LISTING.



31. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK1 deposited as Accession No. FERM BP-5044 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the variable region of the L chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID 10 NO:3 of SEQUENCE LISTING.

32. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK2 deposited as Accession No. FERM BP-5045 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the variable region of the H chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID 20 NO:5 of SEQUENCE LISTING.

33. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK2 deposited as Accession No. FERM BP-5045 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and



Technology; and (2) the variable region of the L chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:7 of SEQUENCE LISTING.

34. The monoclonal antibody or the active fragment  
5 thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK3 deposited as Accession No. FERM BP-5046 in National Institute of Bioscience and  
10 Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the variable region of the H chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:9 of SEQUENCE LISTING.

35. The monoclonal antibody or the active fragment  
15 thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK4 deposited as Accession No. FERM BP-5047 in National Institute of Bioscience and  
20 Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the variable region of the H chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:11 of SEQUENCE LISTING.

36. The monoclonal antibody or the active fragment  
25 thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an

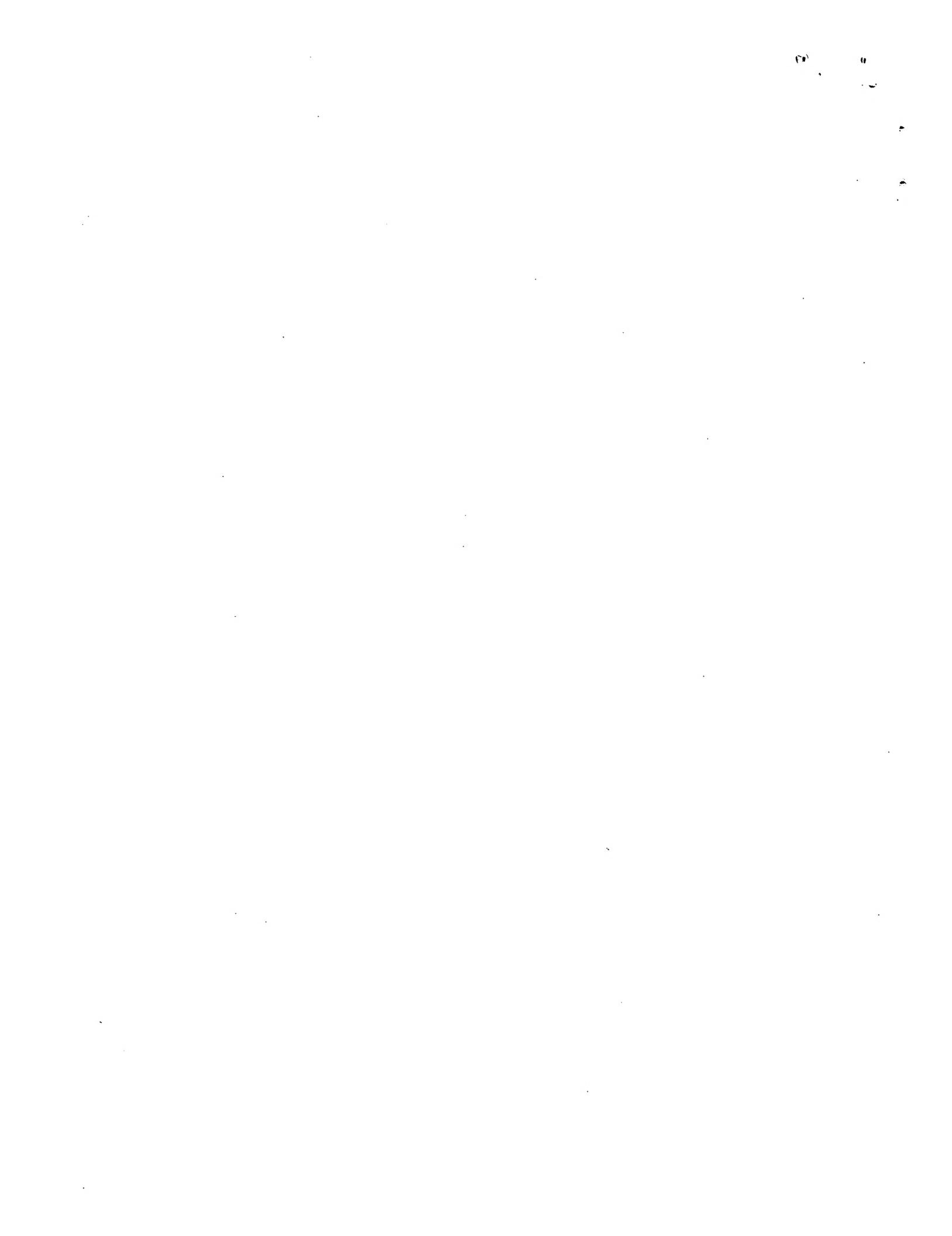


antibody produced by Hybridoma NOK4 deposited as Accession No. FERM BP-5047 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the variable region of the L chain 5 consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:13 of SEQUENCE LISTING.

37. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the 10 inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK5 deposited as Accession No. FERM BP-5048 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the variable region of the H chain 15 consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:15 of SEQUENCE LISTING.

38. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the 20 inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK5 deposited as Accession No. FERM BP-5048 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the variable region of the L chain 25 consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:17 of SEQUENCE LISTING.

39. Mutants of the monoclonal antibody or the active



fragment thereof according to any one of Claims 19 to 28 and 30 to 38.

40. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against 5 human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK1 deposited as Accession No. FERM BP-5044 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and 10 Technology; and (2) the variable region of the H chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:19 of SEQUENCE LISTING.

41. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against 15 human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK1 deposited as Accession No. FERM BP-5044 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and 20 Technology; and (2) the variable region of the L chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:21 of SEQUENCE LISTING.

42. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against 25 human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK2 deposited as Accession



No. FERM BP-5045 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the variable region of the H chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID 5 NO:23 of SEQUENCE LISTING.

43. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an 10 antibody produced by Hybridoma NOK2 deposited as Accession No. FERM BP-5045 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the variable region of the L chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID 15 NO:25 of SEQUENCE LISTING.

44. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an 20 antibody produced by Hybridoma NOK3 deposited as Accession No. FERM BP-5046 in National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the variable region of the H chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID 25 NO:27 of SEQUENCE LISTING.

45. The monoclonal antibody or the active fragment thereof according to Claim 1, which is an antibody against



human Fas ligand and has the following features: (1) the inhibitory effect on apoptosis being equal to that of an antibody produced by Hybridoma NOK3 deposited as Accession No. FERM BP-5046 in National Institute of Bioscience and

5 Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology; and (2) the variable region of the L chain consisting of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:29 of SEQUENCE LISTING.

46. DNAs or RNAs comprising at least a portion  
10 encoding the variable region of the H chain or L chain in the monoclonal antibody or the active fragment thereof according to any one of Claims 30 to 45.

47. A process for producing monoclonal antibodies specifically reacting with a Fas ligand, which comprises  
15 the steps of (1) immunosensitizing an animal with a Fas ligand molecule or cells on which the Fas ligand has been expressed, (2) preparing antibody-producing cells from the immunosensitized animal to form a suspension of the antibody-producing cells, (3) mixing the suspension of the  
20 antibody-producing cells with myeloma cells to fuse both cells, (4) diluting the fused cells with a medium which does not favor unfused myeloma cells to culture the fused cells, thereby sorting hybridomas produced by the fusion of the antibody-producing cells with the myeloma cells,  
25 (5) determining whether antibodies secreted in a culture supernatant containing the hybridomas are against the desired antigen or not using, as an indicator, the fact



that the antibodies inhibit the attack of a Fas ligand present in a supernatant of Fas ligand-expressed COS cells against Fas-expressed cells, (6) cloning a series of cells in culture wells in which cells secreting the desired 5 antibodies exist, (7) selecting a clone from which the desired antibody is secreted, (8) conducting cloning again to establish a hybridoma clone which secretes a monoclonal antibody against the desired antigen, and (9) preparing the monoclonal antibody from a culture supernatant of the 10 hybridoma or ascites fluid obtained by intraperitoneally administering the hybridoma to a mouse.

48. The production process of the monoclonal antibodies according to Claim 47, wherein in the step (1), an animal (excluding the human), which does not express a 15 functional Fas molecule, is immunosensitized with a Fas ligand molecule or Fas ligand-expressed cells.

49. The production process according to Claim 48, wherein the animal is a rodent belonging to MRL lpr/lpr mice.

20 50. The production process according to Claim 48, wherein the animal is a rodent belonging to MRL gld mice.

51. A hybridoma which produces a monoclonal antibody specifically reacting with a Fas ligand present on a cell surface.

25 52. A method of detecting a Fas ligand in a solution, which comprises combining a plurality of monoclonal antibodies against Fas ligand with each other.



53. The detection method according to Claim 52,  
wherein one of the plural monoclonal antibodies is  
immobilized on a carrier, the other monoclonal antibody is  
labeled with a labeled compound, the carrier on which the  
5 monoclonal antibody has been immobilized is immersed in a  
solution of a specimen which is considered to contain a  
Fas ligand, thereby adsorbing the specimen, and the  
adsorbed specimen is detected by the monoclonal antibody  
labeled with the labeled compound.

10 54. The detection method according to Claim 53,  
wherein a purified monoclonal antibody of IgM type is  
immobilized on a carrier, and a Fas ligand in a solution  
is detected by a biotin-labeled monoclonal antibody of IgG  
type.

15 55. A kit for use in detecting a Fas ligand,  
comprising in combination a plurality of monoclonal  
antibodies against Fas ligand.

56. The kit according to Claim 55, which detects a  
concentration of a Fas ligand in the blood of a person  
20 attacked by infectious mononucleosis (IM), systemic lupus  
erythematoses (SLE) or hepatitis.

